

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Papel de la interleuquina-11 en la biología del adenocarcinoma
de pulmón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Laura Ojeda Márquez

Directores

Luis Paz-Ares Rodríguez
Irene Ferrer Sánchez

Madrid

© Laura Ojeda Márquez, 2019

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**PAPEL DE LA INTERLEUQUINA-11 EN LA
BIOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN**

Tesis Doctoral

Madrid, 2019

Laura Ojeda Márquez, Licenciada en Biología

Dirección:

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez

Dr. Irene Ferrer Sánchez

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Medicina
Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



**PAPEL DE LA INTERLEUQUINA-11 EN LA BIOLOGÍA
DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN**

Tesis Doctoral
Madrid, 2019

Laura Ojeda Márquez

Dirección:

Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez

Dr. Irene Ferrer Sánchez

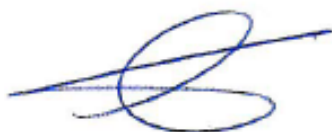
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña. **Laura Ojeda Márquez**, estudiante en el Programa de Doctorado en Investigación Biomédica, de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada ***Papel de la interleuquina-11 en la biología del adenocarcinoma de pulmón*** y dirigida por el Prof. Luis Paz-Ares Rodríguez y la Dra. Irene Ferrer Sánchez,

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita. Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 15 de Julio de 2019



Fdo.: **Laura Ojeda Márquez**

Trabajo realizado bajo el amparo científico y material de la **Unidad de Investigación Clínica en Cáncer de Pulmón H12O-CNIO**, perteneciente al Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre, al Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y a la Universidad Complutense de Madrid, para optar al grado de Doctor en Investigación Biomédica.

El proyecto ha sido financiado con una ayuda de **Formación de Profesorado Universitario (FPU)**, del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU13-02595).

PAPEL DE LA INTERLEUQUINA-11 EN LA BIOLOGÍA DEL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

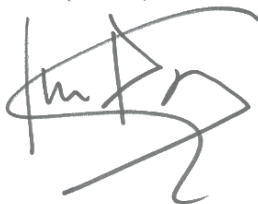
La finalidad del presente informe es avalar la idoneidad del trabajo de tesis realizado para su defensa ante un Tribunal.

Laura Ojeda comenzó su tesis en nuestro laboratorio en 2014 y desde entonces ha llevado a cabo los experimentos con gran motivación y eficiencia, y ha destacado por la correcta interpretación y valoración de los resultados obtenidos. Dichos resultados son coherentes con la línea de investigación realizada y constituyen una sólida tesis doctoral. Después de estos años de investigación científica, la doctoranda ha demostrado estar preparada para la lectura de su tesis doctoral.

Por los motivos aquí expuestos y mediante la presente, autorizamos a Laura Ojeda a leer su tesis doctoral ante el tribunal que la comisión considere apropiado para optar al título de Doctor.

Madrid, 15 de Julio de 2019

El Director:



Luis Paz-Ares Rodríguez

La Directora:



Irene Ferrer Sánchez

AGRADECIMIENTOS

Ningún resultado positivo, por bueno que sea, se disfruta igual si no tienes al lado personas con las que compartirlo. Durante la tesis he tenido la suerte de cruzarme con gente maravillosa a la que tengo mucho que agradecer.

Gracias a Sonia y Mariló, que confiaron en que yo podría sacar adelante este proyecto. No tuve la suerte de coincidir mucho con Mariló, pero Sonia se convirtió esa persona esencial para todo el grupo. Gracias por el cariño y el apoyo que me diste desde el principio y que a día de hoy aún siento.

Gracias a mi director de tesis, que quiso que formara parte de su equipo. Es un orgullo para mí poder decir que Luis Paz-Ares, una de las personas más exitosas que conozco, ha dirigido mi tesis. Has logrado tener un laboratorio con unos medios ideales para desarrollar por completo nuestro potencial. Te admiraré y respetaré siempre por todo lo que me has ayudado en estos años. Gracias por tus genialidades.

Gracias a mi directora, Irene. Llegaste al laboratorio con aportaciones que nos hicieron crecer muchísimo. Me has guiado en ocasiones en las que estaba perdida, hemos compartido muchos momentos de risas y lágrimas, y has sido una gran mentora. Ojalá sigas triunfando tanto como te mereces.

Gracias a mis tutoras primero Elvira y luego Rosa, y también a Mari Ángeles Vicente, por estar ahí siempre para los estudiantes. Gracias los departamentos de Inmunología y de Bioquímica y Biología Molecular III, que me dieron la oportunidad de realizar tareas docentes, una experiencia buenísima y gracias a la cual he conocido a grandes personas.

Gracias, laboratorio 215. El IBiS fue esa primera casa a la que guardas especial cariño. Ricardo, Ana, Carmen, Mari Ángeles, Clara... parece que fue ayer cuando ese camión lleno de cosas se vino a la gran ciudad y un trocito de nuestro corazón se quedó con vosotros allí. Gracias también al 214-216, ejemplo del esfuerzo por hacer ciencia de nivel. Gracias a Amancio, que me ayudaste mis primeros pasos. Gracias a los dolores de tripa por las risas con Antonio. Cuánto admiro a Blanca, cuánto le debo a Manu... Manu, cómo agradecerle tanta amistad, tanta complicidad y tanto cariño. Qué suerte empezar en Sevilla y poder encontrarlos.

Gracias a todos mis compañeros del grupo H12O-CNIO. En especial, Rocío, Ángela y Álvaro, por todo lo vivido juntos, primero en Sevilla y luego en Madrid. Rocío, muchas gracias por enseñarme en mis comienzos, por tu ingenio y por los ratos de bromas. Ángela, desde el principio supe que seríamos amigas y has sido uno de mis grandes apoyos en todo este tiempo. Gracias por estar siempre ahí, por tu carisma y la positividad que desprendes con todos los que te rodean. Gracias a Rocío García-Carbonero y a todo su grupo con el que seguimos compartiendo grandes momentos. Gracias Teresa y Virginia, que me han echado una mano en varias ocasiones también. Al resto de mis compañeros del Hospital Doce de Octubre, sois ya muchos y es muy difícil tener palabras para todos, pero gracias por los ratos de risas, el buen rollo y por alguna que otra charla de cómo salvar el mundo científico. Gracias a Eva, que junto a Irene hace que dos laboratorios llenos de gente funcionen y formen un equipo.

En el CNIO también seguimos creciendo y para mí, la llegada de Cristina y Patri C. significó un antes y un después. Fuisteis ese aire fresco que hizo que retomara mis ganas de ir al laboratorio cada día y el grupo ganó calidad con vuestras aportaciones. Cris, mil gracias por el gran apoyo que has significado para mí y por lo que aportas científicamente al grupo. Eres genial. Patri C., Ali, Lorena y Laura, la ayuda que suponéis para nosotros y el trabajo que realizáis cada día hacen que seáis esenciales para el laboratorio entero. Ali y Lore, llegasteis al final y me habéis dado un gran empujón y muchas risas. Me hacéis sentir feliz en un trabajo que no siempre es agradecido. Y gracias también a mis compañeros Patri y Santi porque siempre hay algo que aprender y buenos momentos que recordar. Alba, a pesar de ser la más pequeña, me has ayudado

muchísimo también. Se que te va a ir muy bien porque tienes un potencial que has demostrado desde el principio. Gracias a Ángel, que también pasa muchos ratos en la pecera a mi lado, apoyándome y escuchándome cuando he necesitado una palabra amiga. Gracias a Raquel, que siempre está para echar una mano en todo lo que necesitamos y para darnos un empujón de energía.

Por supuesto, gracias a otros grupos, unidades y servicios del CNIO y del Doce de Octubre, que con sus equipos de profesionales siempre nos facilitan el trabajo día a día.

Gracias al laboratorio del Dr. Alejandro Sweet-Cordero, que me acogió en mi estancia en la UCSF, y a todas las personas increíbles que conocí en California, y que hicieron de esos 3 meses una de las mejores experiencias de mi vida. Gracias, en especial a Esther y a Jesús, que compartisteis muy de cerca conmigo esa aventura y tantos momentos legendarios.

Gracias, a mis amigas Ana Mari, Laura y Haydeé. Ana Mari, mi mejor amiga de la carrera...cuánto me ayudaste siempre. Cuánto admiro lo inteligente y trabajadora que eres. Nunca se me olvidará que “Las cosas son más difíciles de pensar que de hacer”. Laura, eres un ejemplo de que, por difícil que parezcan las cosas, con esfuerzo y energía positiva se pueden cumplir grandes objetivos. Gracias a Haydeé, que también está siempre al otro lado del teléfono, escuchando mis audios interminables, aportándome siempre ideas positivas e interesándose por todo lo que esta tesis ha supuesto. Sois ejemplo a seguir.

Gracias, a mis mejores amigas de vida, las de siempre, María y Bárbara. Aunque no os dedicáis a esto, os habéis esforzado por entenderme, por ayudarme, por darme ese empuje que en muchas ocasiones he necesitado. Sois el resultado de 28 años de amistad intacta y sincera. “And after all, you are my wonderwall”. Gracias a M. Brenes, que también ha sido un gran apoyo desde hace mucho y no solo con esta tesis. Gracias a mi familia y a mis amigos de Alcalá de Henares, personas que siempre suman. Y en especial, a mi tía y a mi prima Natalia. Hicisteis muy fácil mi comienzo, cuando para mí Madrid era solo una ciudad llena de coches.

Gracias a Alex, mi chico, mi mejor amigo, mi apoyo sin condiciones. Viniste a tiempo: ni tarde ni temprano. Eres mi hogar en Madrid. El impulso que me has dado ha sido clave para acabar este proyecto con una sonrisa en la boca, a pesar de todos los momentos de estrés y agobio que has tenido que aguantar, siempre ayudándome en todo. Soy tremendamente afortunada por tenerte a ti y sentir que también formo parte de tu familia. “Llegaste en el mejor momento para quedarte”.

Gracias, a mi madre y a mi hermana, los dos pilares de mi vida. Mi madre, la persona a la que más admiro. Se que tener una hija lejos de casa no es fácil. Gracias por la educación que nos has dado, por lo que siempre nos has cuidado y por conseguir que siempre me sienta completa. Y mi hermana, mi orgullo. Has avanzado conmigo en estos años y he visto como consigues todo lo que te propones, siempre con esfuerzo y perseverancia. Sigue así. Os quiero “porque siempre me lanzas un cable cuando más necesito enchufarme”. Mi cuñado Jose tampoco se queda atrás. He tenido la suerte de que formes parte de mi familia y también he sentido tu apoyo durante todos estos años.

Y finalmente, gracias a ti, que no se si puedes verme, pero siempre has guiado mis pasos. Tuve la suerte de disfrutar 12 años del mejor padre que podría imaginar. Siempre estás en mi cabeza y el día que exponga esta tesis no será menos. “Qué bonito caminar detrás de ti, llevarte siempre delante”.

Los años de tesis han sido la etapa más enriquecedora que mi memoria me permite recordar. Si pudiera retroceder en el tiempo volvería a decir sí a la tesis. Sí, al crecimiento. Sí al abandonar mi zona de confort. Sí al aprender de los fallos, que hacen que valore más mis logros. Sí, porque todo ha merecido la pena. Sí, estoy viviendo un sueño que se cumple. Sí, por fin seré doctora.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es la primera causa de mortalidad neoplásica a nivel mundial debido a su elevada incidencia, diagnóstico tardío y a la escasez de terapias efectivas. En los últimos años, su caracterización molecular ha permitido identificar biomarcadores diagnósticos y predictivos y nuevos tratamientos dirigidos a dianas terapéuticas novedades, que han impactado favorablemente en el pronóstico de los pacientes con esta enfermedad. Un buen ejemplo de este paradigma podría representarlo IL-11, una citoquina que ha sido descrita como biomarcador diagnóstico del adenocarcinoma de pulmón, el subtipo histológico más común de las neoplasias de esta localización. Además, se conoce que presenta potencial oncogénico al favorecer determinadas propiedades tumorales y un incremento en su expresión está asociado a un peor pronóstico en diversos tipos de cáncer, lo que la sugiere también como posible diana terapéutica.

En este trabajo hemos estudiado, mediante la realización de técnicas experimentales utilizando líneas celulares, modelos animales y muestras de cohortes de pacientes, el papel pro-oncogénico y pronóstico de IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón y evaluamos preliminarmente su posible utilidad como diana terapéutica.

Para caracterizar el papel de IL-11 en la célula tumoral, se sobre-expresó su receptor específico IL-11RA o la propia IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, y se llevaron a cabo ensayos subrogados para estudiar su efecto en diferentes propiedades tumorales. La sobreexpresión de IL-11RA y su estimulación exógena con IL-11 indujo una activación transitoria de la vía JAK/STAT, que se tradujo en un aumento leve de la proliferación y la capacidad de formar colonias a baja densidad. La sobreexpresión de IL-11 también produjo una activación transitoria de la ruta JAK/STAT y, como consecuencia, un ligero aumento de algunas de las propiedades tumorales estudiadas *in vitro* como la proliferación o la migración. Sin embargo, la suma del efecto de la sobre-expresión de las dos proteínas IL-11 e IL-11RA en un ensayo de co-crecimiento *in vivo*, mediante el uso de modelos de *xenograft* co-inyectando las dos líneas celulares, demostró una magnitud de aumento en el crecimiento de los tumores superior. Por otra parte, el silenciamiento de IL-11 o de su receptor, dieron lugar a una disminución prolongada de la activación de la ruta JAK/STAT, que se tradujo en una disminución significativa de todas las propiedades tumorales analizadas *in vitro* y en una parada muy pronunciada en el crecimiento de los tumores *in vivo*. Estos resultados indican que la IL-11 podría tener efecto pro-tumoral en el adenocarcinoma pulmonar. Además, el hecho de que los efectos de IL-11 fueran más acusados en los experimentos *in vivo*, sugería que además del efecto sobre la célula tumoral, podría tener un efecto importante en el microambiente del tumor.

Para analizar el papel de IL-11 sobre el microambiente tumoral, nos centramos en esta tesis en su efecto sobre los fibroblastos, ya que se había descrito que los fibroblastos asociados al tumor (CAFs) secretaban dicha citoquina. Confirmamos que estas células expresaban niveles de IL-11 mayores que las líneas tumorales y que además esta expresión aumentaba en presencia de medio de líneas celulares tumorales, indicando la posibilidad de que los CAFs pudieran una fuente relevante de expresión de IL-11 en los tumores. Teniendo en cuenta la caracterización molecular de estas células, IL-11 activó las vías JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT en los fibroblastos. Además, el silenciamiento de IL-11 disminuyó la capacidad de proliferar y de migrar en los fibroblastos analizados, lo que indicaba que IL-11 también podía modular el comportamiento del estroma tumoral. Finalmente, se utilizaron fibroblastos con silenciamiento y sobre-expresión de IL-11 para estudiar la influencia que ésta podría tener en el secretoma de los mismos. En términos generales, la sobreexpresión de IL-11 aumentó la secreción de citoquinas y factores de crecimiento con un papel pro-tumoral descrito, mientras que el silenciamiento de IL-11 disminuyó la expresión de los mismos y aumentó la de otras citoquinas con papel anti-tumoral. Este cambio en la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que intervienen en el desarrollo tumoral confirmaba el efecto que IL-11 podría ejercer sobre el microambiente.

En línea con estos resultados, se utilizaron modelos animales que recrearan con más precisión la complejidad de los tumores humanos, es decir, en los que pudiéramos tener en cuenta el papel de IL-11, no sólo sobre la célula tumoral, sino también sobre el estroma. En base a esto, se trataron modelos de adenocarcinoma de pulmón (modelos PDX y el modelo genéticamente modificado *KRAS*^{L^{SLG12}V^{geo}:P53^{LoxP}) para realizar estimulaciones con IL-11 recombinante. La estimulación con IL-11 aumentó el tamaño de los tumores en ambos modelos y el número de los mismos en el modelo genéticamente modificado. Este resultado apoyaba los resultados anteriores, y confirmaba el posible efecto pro-oncogénico de IL-11 *in vivo* en el adenocarcinoma de pulmón.}

En relación a la prognosis, el análisis de la expresión de IL-11 a nivel de proteína y ARNm en dos cohortes independientes de pacientes indicó que una alta expresión de IL-11 correlacionaba con una menor supervivencia en pacientes con adenocarcinoma de pulmón, lo que confirmaba su papel como biomarcador pronóstico previamente descrito para otros tipos de tumores.

Finalmente, se estudió la inhibición de la vía de IL-11 como posible estrategia terapéutica. Para ello, se generó un anticuerpo frente a IL-11RA con acción neutralizante de la vía y se comprobó su eficacia en un modelo PDX de adenocarcinoma pulmonar. La neutralización de la vía de IL-11 dio lugar a una disminución significativa en el tamaño de

los tumores, lo que sugería que IL-11 podría ser utilizada como futura diana terapéutica para el adenocarcinoma de pulmón.

En vista de los resultados obtenidos en este proyecto de tesis doctoral, proponemos que la citoquina IL-11 tiene un efecto pro-oncogénico en el adenocarcinoma de pulmón, actuando tanto a nivel de la propia célula tumoral como a nivel del microambiente tumoral. Tales hechos son consistentes con la observación de que un aumento en su expresión tumoral se correlacione con un peor pronóstico en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Adicionalmente, la inhibición de la vía de IL-11 eficaz en modelos preclínicos de adenocarcinoma de pulmón, lo que sugiere que representaría una potencial estrategia terapéutica a validar y evaluar más exhaustivamente en el contexto clínico de esta enfermedad.

SUMMARY

Lung cancer is the first cause of cancer-related deaths worldwide due to its high incidence, frequent late diagnosis and the limited efficacy of available therapies. During the last few years, the molecular characterization of this disease has allowed the identification of diagnostic and prognostic biomarkers, the discovery of novel therapeutic targets and the development of new treatment strategies that have impacted into the outcome of patients. One explicit example of this paradigm is IL-11, described as a diagnostic biomarker for lung adenocarcinoma, the most common histological subtype of lung cancer. In addition, it is known that IL-11 exerts pro-oncogenic properties by promoting several tumor properties and the high expression of this protein is associated with a worse prognosis in several types of cancer, which also suggest IL-11 as a potential new therapeutic target for cancer treatment.

In this work we have studied, using cell lines, animal models and cohorts of patients, the pro-oncogenic and prognostic role of IL-11 in lung adenocarcinoma, and preliminary evaluate its possible use as a therapeutic target.

The IL-11 specific receptor subunit, IL-11RA or IL-11 itself were over-expressed in lung adenocarcinoma cell lines in order to characterize the role of this cytokine in tumor cells and then surrogate assays were carried out to study its influence on different tumor properties. The over-expression of IL-11RA and the exogenous stimulation with recombinant human IL-11 (rhIL-11) led to a transient activation of the JAK/STAT pathway, which resulted in a slight increase of some tumor properties such as proliferation and the ability to form colonies at low density. The over-expression of IL-11 also induced a transient activation of the JAK/STAT pathway and in turn a slight increase in some tumorigenic properties *in vitro*, such as proliferation and migration. However, through the generation of xenograft models with subcutaneous co-injection of cells over-expressing IL-11 or IL-11RA we obtained a significant increase in the tumor growth. On the other hand, the silencing of IL-11 or IL-11RA led to a long-term abrogation of the JAK/STAT pathway, which resulted in a significant decrease in the tumor properties analyzed *in vitro* and arrested the tumor growth *in vivo*. The previous results indicate that IL-11 could exert pro-oncogenic effects in lung adenocarcinoma. In addition, our results suggest that IL-11 could influence the tumor microenvironment as the effects observed were more pronounced when performing *in vivo* assays.

In order to analyze the role of IL-11 on the tumor microenvironment we have studied its effect in the biology of fibroblasts as it is known that tumor-associated fibroblasts (CAFs) can secrete this cytokine. We have confirmed that these cells expressed higher levels of

IL-11 than by tumor cell lines. Moreover, this expression also increased in the presence of conditioned media from tumor cell lines, indicating that CAFs could be a major source of IL-11 in tumors. Regarding the molecular characterization, when fibroblasts were stimulated with IL-11, the JAK/STAT, RAS/ERK and PI3K/AKT pathways were activated. Furthermore, IL-11 silencing in fibroblasts decreased their ability to proliferate and migrate, which indicate that IL-11 could also modulate the behavior of the tumor stroma. Finally, to study the indirect effect of IL-11 in depth, we analyzed the secretome of fibroblasts when silencing and over-expressing IL-11. In general terms, over-expression of IL-11 increased the secretion of cytokines and growth factors with pro-tumoral roles while its silencing decreased their expression, but increased the secretion of other cytokines with anti-tumoral properties. These changes in the secretion of tumor-related proteins confirm the possible effect of IL-11 on the tumor microenvironment.

In accordance with these results, animal models were used to mimic more precisely the characteristics of human tumors and take into account not only the tumor cells but also the microenvironment. Based on this observation, mice models with lung adenocarcinoma (PDXs and the genetically modified model *KRAS*^{LSLG12V_{geo}}:*P53*^{LoxP}) were stimulated with rhIL-11 that increased tumor growth in both models and the number of tumors in genetically modified mice. This result supported our previous results and confirmed the possible pro-oncogenic effect of IL-11 *in vivo* in lung adenocarcinoma.

Focusing on the prognosis, the analysis of the IL-11 protein and mRNA expression in two independent cohorts of patients indicated that an increased expression of this cytokine correlated with a lower survival in patients with lung adenocarcinoma. This finding confirmed the role of IL-11 as a prognostic biomarker, previously described in other types of tumors.

Finally, the inhibition of the IL-11 pathway was analyzed as a possible therapeutic strategy. To achieve this objective, an IL-11RA neutralizing monoclonal antibody was generated and its efficacy was tested in a PDX model of lung adenocarcinoma. The neutralization of the IL-11 pathway resulted in a significant decrease in tumor growth, suggesting that IL-11 could be used as a future therapeutic target for lung adenocarcinoma.

In view of the results obtained in this doctoral thesis project, we propose that the cytokine IL-11 plays a pro-oncogenic role in lung adenocarcinoma, acting on the tumor cells but on the tumor microenvironment as well. This effect is supported by the fact that high tumor IL-11 expression correlates with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma, and additionally, the inhibition of the IL-11 pathway is an effective

therapeutic strategy in mice models of lung adenocarcinoma. For all these reasons IL-11 represents a potential therapeutic strategy that warrants to be studied more exhaustively in the clinical context of this disease.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	xi
RESUMEN	xv
SUMMARY	xviii
INTRODUCCIÓN	1
1. CÁNCER	3
1.1. Biología del cáncer	3
1.2. Papel del microambiente y la inflamación en la tumorigénesis	7
1.2.1. Composición del tumor	7
1.2.2. Papel de la inflamación en la tumorigénesis	10
2. CÁNCER DE PULMÓN	11
2.1. Epidemiología y clasificación histológica	11
2.2. Biología molecular del cáncer de pulmón y terapias dirigidas	13
3. CITOQUINAS DE LA FAMILIA DE LA INTERLEUQUINA-6	17
3.1. Características estructurales, de señalización y funcionales de la familia de la IL-6	17
3.2. Papel de la familia de la IL-6 en el cáncer	20
3.2.1. Efecto de la familia de la IL-6 sobre las células tumorales	20
3.2.2... Efectos de la familia de la IL-6 sobre otras células del microambiente tumoral	21
3.2.3. Citoquinas como estrategia terapéutica	22
4. INTERLEUQUINA-11 Y SU RELACIÓN CON INFLAMACIÓN Y CÁNCER	24
4.1. Características de la IL-11 y su receptor específico IL-11RA	24
4.2. Papel de IL-11 en tumores asociados a la inflamación	26
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	35
MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. REACTIVOS BIOLÓGICOS	41
1.1. Plásmidos	41
1.2. Antibióticos de selección	41
1.3. Cepas bacterianas	42
1.4. Sondas de PCR a tiempo real	42
1.5. Anticuerpos	42
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	44
2.1. Amplificación plasmídica	44
2.1.1. Transformación de células quimiocompetentes	44
2.1.2. Extracción de ADN plasmídico	44

2.2.	Obtención de plásmidos CRISPR con ARN guías	45
2.2.1.	Diseño y síntesis de ARNs guías (sgARNs).....	45
2.2.2.	Clonaje de sgARNs en un vector lentiviral	46
2.3.	Análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero (ARNm).....	48
2.3.1.	Extracción de ARN	48
2.3.2.	Transcripción reversa	48
2.3.3.	PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).....	49
2.3.4.	Análisis de la expresión de ARN por ARNseq.....	50
2.4.	Análisis de la expresión a nivel proteico	50
2.4.1.	Extracción de proteínas	50
2.4.2.	Cuantificación proteica	51
2.4.3.	<i>Western Blot</i> (WB)	51
2.4.4.	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	53
2.4.4.1.	<i>ELISA de IL-11</i>	53
2.4.4.2.	<i>ELISA multiplex de citoquinas</i>	54
2.4.5.	Inmunohistoquímica (IHQ)	55
2.5.	Generación del anticuerpo neutralizante anti-IL-11RA	56
3.	TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	57
3.1.	Líneas celulares	57
3.2.	Conservación de las líneas celulares	59
3.3.	Tansfección de células.....	59
3.4.	Infección de células con plásmidos lentivirales.....	62
3.4.1.	Transfección de células productoras de virus	62
3.3.1.	Infección de células de interés.....	62
3.4.2.	Selección de células de interés.....	63
3.5.	Ensayos celulares funcionales y de señalización	64
3.5.1.	Ensayo de medios condicionados	64
3.5.2.	Caracterización de vías de señalización	64
3.5.3.	Determinación de la duración de la activación de cascadas de señalización	65
3.5.4.	Ensayos subrogados de diferentes propiedades tumorigénicas.....	65
3.5.4.1.	<i>Ensayo de proliferación (Curvas de crecimiento a 5% SFB)</i>	65
3.5.4.2.	<i>Ensayo de crecimiento en ausencia de suero (Curvas de crecimiento al 0% SFB)</i>	66
3.5.4.3.	<i>Ensayo de clonabilidad</i>	66
3.5.4.4.	<i>Crecimiento libre de anclaje (ensayo en agar blando)</i>	66
3.5.4.5.	<i>Ensayo de migración</i>	66

3.5.4.6. <i>Ensayos funcionales en co-cultivos indirectos de diferentes células tumorales</i>	67
3.6. Generación de organoides de modelos PDX (Cultivos celulares 3D)	68
3.7. Comprobación de la acción neutralizante del anticuerpo anti-IL-11RA <i>in vitro</i>	68
4. TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	69
4.1. Xenografts de líneas celulares	69
4.1.1. Inyección subcutánea de las líneas celulares	69
4.1.2. Seguimiento de los tumores y determinación del crecimiento tumoral	70
4.2. Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDXs)	71
4.2.1. Establecimiento de colección de modelos PDX	71
4.2.2. Estimulación de modelos PDX con rhIL-11	72
4.2.3. Tratamiento de modelos PDX con el anticuerpo neutralizante de IL-11RA	72
4.3. Modelos animales genéticamente modificados (GEMMs).....	73
4.3.1. Inducción de tumores.....	73
4.3.2. Estimulación con rhIL-11 en modelos animales con adenocarcinoma pulmonar producidos por <i>KRAS/P53</i>	74
5. COHORTES CLÍNICAS.....	75
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	77
6.1. Análisis de los experimentos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	77
6.2. Análisis de las cohortes clínicas	77
RESULTADOS	79
1. PAPEL DE IL-11 EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN	81
1.1. Papel de IL-11 en la célula tumoral <i>in vitro</i> en <i>in vivo</i>	81
1.1.1. Caracterización de la señalización de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón	81
1.1.2. Efecto de la sobre-expresión de IL-11RA y su estimulación con rhIL-11 exógena <i>in vitro</i>	84
1.1.3. Efecto de la sobre-expresión de IL-11 <i>in vitro</i>	87
1.1.4. Co-expresión de IL-11 e IL-11RA <i>in vitro</i>	89
1.1.5. Efecto de la co-expresión de IL-11 e IL-11RA mediante co-cultivos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	90
1.1.6. Efecto del silenciamiento de IL-11 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	93
1.1.7. Efecto del silenciamiento de IL-11RA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	96
1.2. Papel de il-11 en el estroma tumoral <i>in vitro</i>	99
1.3. Papel de Il-11 en modelos animales de adenocarcinoma de pulmón.....	104
1.3.1. Efecto de la estimulación de IL-11 en modelos PDX.....	104
1.3.2. Efecto de la estimulación de IL-11 en modelos genéticamente modificados	108

2. PAPEL DE IL-11 COMO BIOMARCADOR PRONÓSTICO	110
3. PAPEL DE IL-11 COMO DIANA TERAPÉUTICA	114
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	139

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AKT	Quinasa de proteínas B
ALK	Quinasa de linfoma anaplásico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
B2M	Beta-2 microglobulina
BAK	Antagonista 1 de <i>BCL-2</i>
BCL-2	Del inglés <i>B-cell lymphoma 2</i>
BNDF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BRAF	Homólogo B del oncogén viral de sarcoma murino v-Raf
BAX	Regulador X de la apoptosis asociado a <i>BCL-2</i>
CAA	Célula adiposa asociada a tumor (<i>cancer-associated adipose cell</i>)
CAF	Fibroblasto asociado a tumor (<i>cancer-associated fibroblast</i>)
CAR	Receptor de antígeno quimérico
CCL-1	Del inglés <i>Chemokine (C-C motif) ligand 1</i>
CLC	Citoquina similar a la cardiotropina
CNTF	Factor neurotrópico ciliar
CSC	Célula madre cancerosa (<i>cancer stem cell</i>)
CT-1	Cardiotropina 1
CXCL	Del inglés <i>Chemoquine C-X-C- motif ligand</i>
DMEM	Medio modificado fosfato de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGF	Receptor de crecimiento epidérmico
ELISA	Del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EML4	Proteína asociada a microtúbulo de equinodermo 4
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FDA	Del inglés <i>food and drug administration</i>
FGFR1	Receptor de factor de crecimiento fibroblástico 1
FGF2	Factor de crecimiento fibroblástico 2
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GEMM	Modelo animal genéticamente modificado (<i>Genetically engineered mouse model</i>)
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GP130	Glucoproteína 130

GRO- α	Proteína alfa regulada por el crecimiento de quimioquinas
HER	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
IFN	Interferón
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleuquina
IL-11	Interleuquina-11
IL-11RA	Receptor alfa de la interleuquina-11
JAK	Del inglés <i>Janus quinase</i>
KRAS	Homólogo al oncogén viral de sarcoma de rata Kirsten
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LKB1	Serina/Treonina quinasa 11 (STK11)
MAPK	Quinasa de proteínas activada por mitógenos
MET	Receptor del factor de crecimiento hepatocitario
MC	Medio condicionado
MDSC	Célula mieloide supresora (<i>myeloid-derived supresor cell</i>)
MET	Receptor de factor de crecimiento de hepatocitos
MIP-1	Proteína inflamatoria de los macrófagos 1
mTOR	Diana en mamíferos de rapamicina
MYC	Homólogo del oncogén viral de mielociomatosis aviar C-Myc
NTRK	Receptor de Tirosina Quinasa Neurotrófico
NF	Fibroblasto normal, FN (<i>Normal fibroblast</i>)
OSM	Oncostatina M
P16	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A)
PBS	Tampón fosfato alcalino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDX	Xenograft derivado de paciente (<i>Patient derived xenograft</i>)
PEI	Polietilenimina
PI3K	Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,3-bifosfato 3-quinasa
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PV	Plásmido vacío
RANTES	Del inglés <i>Regulation upon Activation Normal T Expressed and Secreted</i>
RB	Proteína del retinoblastoma
rhIL-11	Proteína recombinante humana IL-11

rpm	Revoluciones por minuto
ROS1	Proto-oncogén tirosina proteína quinasa 1
RPMI	Medio del Instituto Rosell Park Memorial
RTqPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
SDF-1	Factor derivado de célula estromal 1
SFB	Suero fetal bovino
sgARN	ARN guía
SMA	Actina del músculo liso
SOCS	Proteína supresora de la señalización por citoquinas 3
STAT	Del inglés <i>Signal Transducer and Activation of Transcription</i>
TAM	Macrófago asociado a tumor (<i>tumor-associated macrophage</i>)
TBS	Del inglés <i>tris-buffered saline</i>
TBST	TBS-Tween20
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Linfocito T <i>helper</i>
TIL	Linfocito infiltrante de tumor (<i>tumor-infiltrating lymphocyte</i>)
TKI	Inhibidor de tirosina quinasa
TNF	Factor de necrosis tumoral
T _{reg}	Linfocito T regulador
TP53	Del inglés <i>tumor protein p53</i>
TN	Triple negativa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TSP-1	Trombospondina 1
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WB	<i>Western Blot</i>

INTRODUCCIÓN

1. CÁNCER

1.1. Biología del cáncer

El término *cáncer* engloba un amplio conjunto de enfermedades de distinto origen cuyo denominador común es la presencia de alteraciones genéticas, las cuales confieren a las células una capacidad incontrolada de crecimiento. Así, las células tumorales cambian su morfología y fisiología, adquiriendo nuevas propiedades que les permiten dar lugar a un tumor primario e incluso escapar e invadir otros tejidos, donde pueden formar metástasis.

Existe un control muy estricto de la homeostasis tisular, gracias a la cual las células se dividen para reparar y regenerar los tejidos. El control de la proliferación celular se establece a través de señales extracelulares y de los puntos de control que regulan el ciclo de división celular, además de por procesos de apoptosis y senescencia [1][2][3]. A pesar de ello, ocurren alteraciones genéticas y epigenéticas de forma arbitraria, por fallos del funcionamiento propio de la maquinaria de replicación y por exposición a agentes ambientales que pueden alterar esta homeostasis. La mayoría de las alteraciones no tienen un efecto relevante en la célula, pero otras, que ocurren en genes denominados conductores o *drivers* pueden conferirle ventajas proliferativas que favorecen la iniciación y la progresión tumoral. Debido al control de la homeostasis tisular, se precisa en general la suma de varias alteraciones moleculares para que una célula normal se transforme y de lugar a un tumor [4][5][6].

Las alteraciones responsables de la transformación a célula tumoral se producen principalmente en tres tipos de genes [7][8]:

- Los **oncogenes**: Son alelos hiperactivos o desregulados de protooncogenes, que son promotores del crecimiento normal y actúan como inductores de la proliferación celular. La mutación o sobre-expresión de estos genes contribuye a que la célula se transforme y adquiera un fenotipo tumoral. La activación oncogénica puede producirse a través de translocaciones cromosómicas, amplificaciones génicas y mutaciones intragénicas. Los oncogenes son dominantes, lo que significa que una sola copia puede causar que la célula exprese el fenotipo alterado.
- Los **genes supresores de tumores**: Actúan como un freno para la proliferación celular excesiva mediante parada del crecimiento, inducción de senescencia o apoptosis. Una mutación que inactive uno de estos genes libera a la célula de las restricciones normales a la división y provoca una proliferación excesiva. La

inactivación de supresores tumorales puede ocurrir a través de mutaciones que alteran su actividad o dan lugar a una proteína truncada, de deleciones, inserciones o por silenciamiento epigenético. Son genes recesivos, por lo que una sola copia del gen es suficiente para presentar un fenotipo normal, aunque hay algunos casos en los que la pérdida de un solo alelo resulta en un fenotipo tumoral.

- **Los genes de reparación del ADN:** Se encargan de la detección del daño genético y de su reparación. La inactivación de estos genes no afecta directamente al control de la proliferación, pero incrementa la tasa de mutación de otros genes, como los protooncogenes y los genes supresores de tumores, acelerando la progresión tumoral. Dicha inactivación ocurre igual que la de los genes supresores de tumores y también suelen ser genes recesivos.

Una característica importante de los tumores es la heterogeneidad intratumoral [6]. El tumor se origina por la división descontrolada de una primera célula, que da lugar a una población de células iguales denominada *clon*. A partir de ese momento, las células de dicho clon también se dividen, acumulando diferentes alteraciones genéticas, y dando lugar a subclones con distinto perfil mutacional. La heterogeneidad intratumoral tiene un papel importante en la progresión del tumor, en la resistencia a terapias y en la recurrencia de la enfermedad [9].

Se han descrito diez propiedades esenciales en la fisiología celular, denominadas señales de identidad del cáncer (*the hallmarks of cancer*), que explican el comportamiento maligno de los tumores [10][11]. Éstas se describen a continuación:

1. **Independencia de señales de crecimiento:** Las células normales necesitan la presencia de señales mitogénicas para dividirse. Las células tumorales, en cambio, reducen su dependencia a la estimulación exógena de diferentes maneras: sobreexpresando ligandos, receptores y otras proteínas que desencadenan señales proliferativas, o expresando formas mutadas de genes que activan de forma constitutiva vías de señalización proliferativa. Un ejemplo de gen mutado que favorece la proliferación es el oncogen *KRAS* [12][13], que activa la ruta de las RAS-MAP kinasas aun en ausencia de las señales fisiológicas producidas por factores de crecimiento.
2. **Insensibilidad a señales antiproliferativas:** En un tejido normal, numerosas señales antiproliferativas se encargan de mantener la quiescencia celular y la homeostasis tisular. La mayoría de las señales antiproliferativas convergen en la proteína RB (proteína del retinoblastoma), activándola y produciendo la parada, reversible o irreversible de la proliferación celular. El proceso tumoral progresa

cuando las células tumorales se hacen insensibles a estas señales [14].

3. **Resistencia a la apoptosis:** La muerte celular programada, o apoptosis, supone una barrera natural para el desarrollo del cáncer. La maquinaria apoptótica, consta de diferentes efectores, como las proteínas caspasas o las de la familia BCL2. Existe una regulación por señales extracelulares e intracelulares, pro y anti-apoptóticas. Las células tumorales adquieren resistencia a la apoptosis de diferentes maneras, pero la más habitual es la pérdida del supresor tumoral *TP53* que es el regulador pro-apoptótico más importante y que se encuentra mutado en el 50% de los tumores humanos [15][16].
4. **Potencial replicativo ilimitado:** Las células tumorales requieren tener un potencial ilimitado para replicarse y generar tumores, al contrario que las células normales, que presentan ciclos limitados de división. En este proceso de inmortalización celular están implicadas diversas proteínas, como la enzima telomerasa, que es una ADN polimerasa que añade segmentos repetitivos de ADN a los extremos teloméricos de los cromosomas. En las células sanas, la actividad telomerasa es muy escasa y, tras un número determinado de divisiones, el acortamiento significativo de los telómeros es una de las señales que induce la senescencia replicativa. El 90% de las células tumorales presentan alta expresión de esta proteína [17]. Las células senescentes, aunque son metabólicamente activas, detienen su crecimiento de forma permanente e irreversible y pueden mantenerse en este estado de viabilidad no proliferativa durante meses. Aunque es un mecanismo de control de la proliferación, la senescencia también está asociada a la reparación de tejidos e inflamación, procesos que están asociados al crecimiento de los tumores [18].
5. **Promoción de la angiogénesis:** Durante la progresión tumoral se promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis, que facilitan la nutrición y oxigenación del tumor en crecimiento. Dicha activación se produce como consecuencia de la modificación del equilibrio entre factores inductores e inhibidores de la angiogénesis, siendo la proteína VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) una de las más importantes en este proceso [19][20]. La vascularización, asimismo, puede favorecer la migración de células tumorales al torrente circulatorio y así difundirse a otros tejidos.
6. **Invasión de tejidos y metástasis:** Las células tumorales sufren cambios con el tiempo, tanto en su morfología como en su capacidad de adhesión, que favorecen su escape al torrente circulatorio, la invasión de otros tejidos y la formación de metástasis. Esta capacidad invasiva la adquieren a través de la activación de proteasas celulares y de la alteración de moléculas de adhesión como la proteína

E-cadherina, fundamental para el mantenimiento del epitelio, o la sobre-expresión de la proteína N-cadherina, que confiere al tejido características mesenquimales [21][22]. Este proceso se denomina transición epitelio-mesénquima (*epithelial-mesenchymal transition*; EMT) y en el contexto del cáncer favorece la expansión tumoral y la resistencia a terapias [23].

- 7. Desregulación del metabolismo energético:** La elevada tasa de proliferación de las células tumorales requiere modificaciones en el metabolismo celular para poder mantenerse. Además, condiciones restrictivas del tumor como la falta de nutrientes, la hipoxia y la acidificación del pH, hacen que sea necesario este cambio metabólico en la célula tumoral [24]. El efecto *Warburg* es la adaptación metabólica más conocida de las células tumorales y consiste en obtener energía en forma de ATP mediante la glucólisis, en lugar de por fosforilación oxidativa, incluso a concentraciones normales de oxígeno. Este cambio supone una forma rápida de obtener ATP, pero es menos eficaz que la fosforilación oxidativa por lo que, para compensar esta menor eficiencia, las células tumorales deben consumir grandes cantidades de glucosa [25].
- 8. Evasión del control inmune:** El sistema inmune está en constante vigilancia para erradicar cualquier célula extraña, incluyendo las que comienzan su proceso de transformación hacia célula tumoral. Sin embargo, las células malignas pueden evadir esta inmunovigilancia mediante diversos mecanismos. Uno de ellos es la alteración de las vías de control inmune o *immune checkpoints*, siendo la ruta de las proteínas PD1/PD-L1 una de las más importantes [26]. PD-L1 es un ligando de PD-1, que es expresado por las células de presentación antigénica y algunos tejidos. Cuando el ligando se une a su receptor impide la activación de las células T, evitando así la inmunogenicidad excesiva y la auto-inmunidad. Las células tumorales pueden expresar PD-L1 y evitar así ser eliminadas por el sistema inmune [27].
- 9. Inestabilidad genómica y mutaciones:** Hay genotipos mutacionales que confieren ventajas adaptativas a diferentes clones celulares, habilitándoles para formar un tumor [4]. Por otra parte, hay cambios epigenéticos y en la regulación de genes que también pueden alterar la fisiología celular. Aunque las diferencias en las alteraciones de genes pueden variar considerablemente en los distintos tipos de tumores, la inestabilidad en el genoma parece ser inherente a la mayoría las células tumorales. Por consiguiente, defectos en el sistema de reparación de daños y del mantenimiento del genoma facilitan la progresión tumoral [28].
- 10. Inflamación tumorigénica:** La inflamación también puede contribuir a aumentar algunas de las capacidades tumorales y favorecer la progresión del cáncer

[29][30]. Las células inmunes pro-inflamatorias secretan moléculas, tales como factores de crecimiento, de supervivencia y pro-angiogénicos, que activan la proliferación y la transición epitelio-mesénquima, aumentando la capacidad de invasión celular [31]. Además, las células inflamatorias pueden secretar también especies reactivas de oxígeno que actúan como agentes mutagénicos [32][33].

1.2. Papel del microambiente y la inflamación en la tumorigénesis

La composición de los tumores ha sido muy estudiada en las últimas décadas y se sabe que su complejidad es elevada y diferente a la de los tejidos sanos. Para entender la biología del tumor, no solo se debe estudiar la célula tumoral sino también su microambiente, que está formado por el estroma tumoral y las células del sistema inmune que lo infiltran o lo rodean.

1.2.1. Composición del tumor

Los tumores están formados por células neoplásicas, células constituyentes del estroma tumoral y células del sistema inmune [11][34][35]. Estos dos tipos celulares constituyen el microambiente tumoral y contribuyen a la progresión del tumor por la secreción de distintas moléculas, que afectan a las células tumorales y a las células sanas de alrededor [36][37], y que pueden ser responsables de la resistencia a determinadas terapias [38].

Los principales tipos celulares que forman parte de un tumor se representan en la figura 1 y se describen a continuación:

- **Células tumorales:** Son las células que constituyen habitualmente la mayor parte de la masa tumoral, y que portan las alteraciones genéticas y epigenéticas responsables de la formación y progresión del tumor. Dentro de estas, se han identificado algunas células con características de células madre, denominadas células madre cancerosas (*cancer stem cells*; CSCs), que presentan capacidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples tipos celulares [39][40].
- **Células del estroma del tumor:** Son células no tumorales que sustentan el tumor y tienen su origen en diferentes tipos celulares que se describen a continuación:
 - Los fibroblastos asociados al tumor o CAFs (*cancer-associated fibroblasts*), que son las células mayoritarias del estroma y, por tanto, con gran influencia sobre el microambiente tumoral. Los fibroblastos dan soporte estructural a los tejidos, pero en ocasiones pueden activarse y sufrir modificaciones en sus propiedades. Un

claro ejemplo de fibroblastos modificados son los miofibroblastos, identificables por expresar la proteína SMA (actina del músculo liso), que no suele encontrarse en tejidos sanos y que generalmente proliferan en heridas y en puntos de inflamación crónica. Los CAFs tienen características que los hacen similares a los miofibroblastos con la peculiaridad de que no revierten su fenotipo activado y no mueren por apoptosis. Aunque el origen de los CAFs aún está siendo estudiado, parece que no solo provienen de la activación de fibroblastos normales sino también pueden generarse a partir de células epiteliales, por transición epitelio-mesénquima o a partir de células endoteliales o de células madre derivadas de la médula ósea [41][42]. Los CAFs favorecen la proliferación, la angiogénesis, la invasión y la metástasis a través de la secreción de una gran variedad de moléculas como CXCL2, que induce la EMT o IL-22, que favorece la invasión [43][38].

- La vasculatura tumoral está formada por células endoteliales y pericitos. Durante el desarrollo del tumor, las células endoteliales próximas, en estado quiescente, son activadas, considerándose esenciales en la formación de nuevos vasos sanguíneos. De esta manera, se favorece el aporte de oxígeno y nutrientes al tumor en crecimiento [44]. Por otro lado, los pericitos son células con prolongaciones, que envuelven los vasos sanguíneos para mantener la presión hidrostática y el flujo de sangre, aportando señales paracrinas al endotelio vascular, como por ejemplo VEGF. Las principales funciones de los pericitos en el tumor son la de estabilizar los vasos sanguíneos y la de favorecer la angiogénesis [45]. Por otra parte, los vasos linfáticos que rodean al tumor pueden suponer una vía de escape de células tumorales a los ganglios regionales y alcanzar así otras localizaciones [46].
- Las células adiposas asociadas a tumor o CAAs (*cancer-associated adipose cells*) favorecen un ambiente hipóxico y pueden promover la inflamación asociada al tumor [47][48]. Además, los adipocitos pueden secretar hormonas y factores como la IL-6, el TNF- α o el VEGF que contribuyen al desarrollo y la progresión tumoral [49].
- **Células del sistema inmune:** Las células inmunes pueden infiltrar el tumor y promover o inhibir la progresión tumoral. En una lesión normal las células inmunes aparecen como respuesta al daño, para promover la reparación del tejido. Durante la formación del tumor, la inflamación sostenida puede dar lugar a la progresión tumoral por la secreción de citoquinas pro-inflamatorias y otras moléculas solubles que favorecen la proliferación, la angiogénesis y la diseminación del tumor [50][51][52]. En el infiltrado de células inmunes se pueden encontrar, entre otras,

macrófagos (macrófagos asociados a tumores o TAMs), neutrófilos y mastocitos, que promueven la inflamación. En el caso de los TAMs, se ha observado un cambio de fenotipo M1, que tiene efecto citotóxico sobre las células tumorales, a M2, que aumenta la secreción de factores de crecimiento, como EGF, FGF o VEGF, que promueven la proliferación de células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales [53]. En el caso de los linfocitos infiltrantes de tumores o TILs, aunque tienen una potente acción en la eliminación de células tumorales, algunas subclases pueden promover el crecimiento tumoral. De esta manera, en el microambiente tumoral se puede favorecer el reclutamiento de células T CD4⁺ (linfocitos cooperadores T_H) y células T reguladoras (T_{reg}), que pueden llegar a promover la tumorigénesis, frente a células T CD8⁺, con acción citotóxica. Un ejemplo de linfocito con acción pro-tumoral es el T_H17 (*T helper 17*), que secreta moléculas como IL-17, IL-8, IL-6 o IL-10 [54]. Por otro lado, la liberación de factores solubles, como INF- γ , IL-1 β o VEGF condicionan la mielopoyesis, aumentando la proliferación de precursores mieloides y bloqueando parcialmente su diferenciación, dando lugar a células mieloides supresoras o MDSCs (*Myeloid-derived suppressor cells*) [55]. Las MDSCs pueden suprimir la función efectora anti-tumoral de algunas células del sistema inmune utilizando diversos mecanismos para modular su respuesta, entre ellos, la liberación del enzima arginasa, que degrada la L-arginina, un aminoácido esencial para la función de los linfocitos T [56][57].

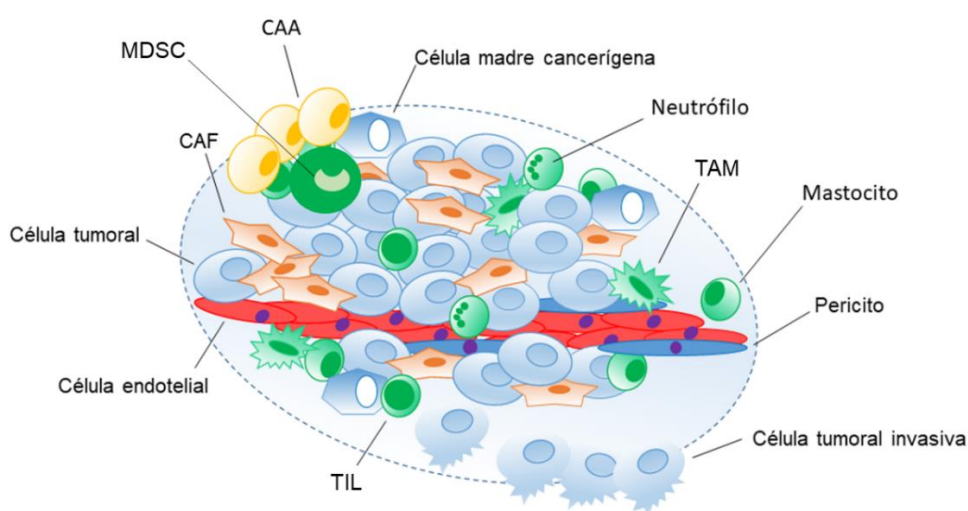


Figura 1. Composición del tumor y su microambiente tumoral. Los tumores sólidos están compuestos por células tumorales y un microambiente compuesto por células estromales y células del sistema inmune. TAM=macrófago asociado a tumor, TIL=Linfocito infiltrante de tumor, CAF=fibroblasto asociado a tumor, MDSC=célula supresora mieloide, CAA=célula adiposa asociada a tumor.

1.2.2. Papel de la inflamación en la tumorigénesis

Dentro del microambiente tumoral, el componente inflamatorio cobra gran importancia. Se sabe que la inflamación no es solo una consecuencia del cáncer sino que también puede ser una de sus causas [31][58]. La relación entre inflamación y cáncer se basa en la activación de factores de transcripción como NF- κ B, STAT3 y HIF-1; y en la acumulación de factores pro-oncogénicos en el microambiente tumoral [59].

Al inicio de la enfermedad, previamente a la formación del tumor, la inflamación puede producirse por factores infecciosos, factores químicos externos o enfermedades inflamatorias. Como ejemplo de infecciones, que promueven una respuesta inflamatoria severa, tendríamos las causadas por *Helicobacter pylori*, que aumenta el riesgo de padecer carcinoma gástrico [29]; la Hepatitis B o C, que aumentan el riesgo de padecer carcinoma hepatocelular [60]; o infecciones por *Schistosoma hematobium*, que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de vejiga [61].

Por otra parte, existen factores químicos externos que producen inflamación y que, por exposición prolongada, pueden promover el desarrollo de carcinomas. Este es el caso del humo del tabaco, que aumenta entre 10 y 30 veces la probabilidad de padecer cáncer de pulmón ya que provoca ciclos de daño y reparación de tejidos, que llevan al desarrollo de inflamación crónica [62]. Otro factor químico ambiental que también aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón debido a su respuesta inflamatoria es la inhalación de asbestos, un material que fue frecuentemente empleado en construcción durante décadas [63].

Como ejemplos claros de enfermedades que producen inflamación crónica tendríamos la enfermedad inflamatoria intestinal denominada colitis ulcerosa, que aumenta el riesgo de padecer cáncer de colon [64]; o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que aumenta hasta cinco veces el riesgo de padecer cáncer de pulmón en pacientes fumadores [65][66].

Sin embargo, la inflamación no solo favorece la iniciación tumoral, sino que también activa todo el proceso tumorigénico. En las etapas iniciales, la inflamación activa la reparación de tejidos e induce la proliferación de células pre-malignas, promoviendo su supervivencia, estimulando la angiogénesis y favoreciendo la inmunosupresión localizada. En el tumor en crecimiento, la inflamación es inducida por el microambiente tumoral mediante secreción de moléculas, como las especies reactivas de oxígeno, que pueden favorecer la aparición de alteraciones genómicas y/o epigenómicas, y factores de crecimiento y citoquinas, que favorecen el crecimiento tumoral. Con el tiempo, los tumores

sólidos pueden alcanzar un tamaño con el cual las zonas más internas, no reciben oxígeno ni nutrientes, produciéndose necrosis y liberación de mediadores pro-inflamatorios que favorecen la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la capacidad de invadir otros tejidos (Figura 2) [33][58].

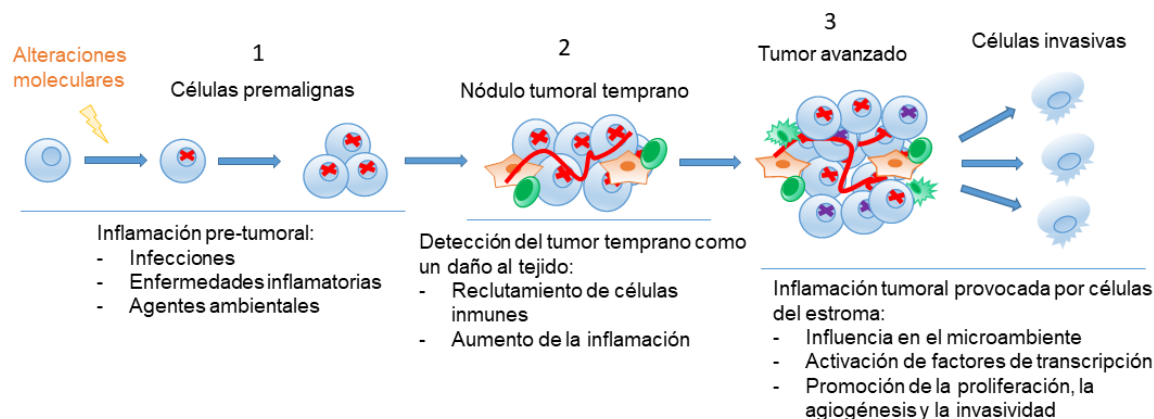


Figura 2. Papel de la inflamación en el desarrollo tumoral. La inflamación influye en todo el proceso tumoral, desde antes de la formación del tumor (1), como al inicio de la aparición del tumor (2) y en la enfermedad avanzada (3).

2. CÁNCER DE PULMÓN

2.1. Epidemiología y clasificación histológica

El cáncer de pulmón es el tipo de tumor más frecuente y con mayor mortalidad a nivel mundial, con el 11.6% de los nuevos casos de cáncer (Figura 3A) y el 18.4% de las muertes por cáncer respectivamente (Figura 3B). Si separamos a la población por géneros, en 2018 fue el cáncer con mayor incidencia en hombres, con un porcentaje de pacientes similar al del cáncer de próstata (14,5% y 13,5% de nuevos casos respectivamente) (Figura 3D), y el tercero más común en mujeres, con un 8,4% de nuevos casos, por detrás del cáncer de mama (24,2%) y con un porcentaje de pacientes similar al del cáncer colorectal (9,5%) (Figura 3C) (datos obtenidos del estudio *Globocan 2018* llevado a cabo por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer) [67].

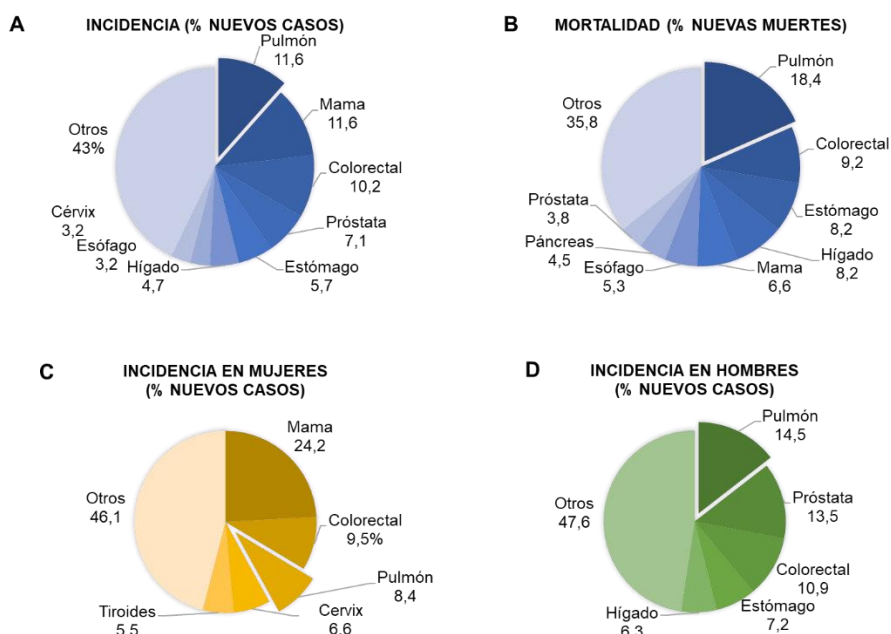


Figura 3. Incidencia y mortalidad por cáncer en 2018. Incidencia (A) y mortalidad (B) de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial. Incidencia separada por sexos, en mujeres (C) y hombres (D). Estudio Globocan 2018.

Las cifras estimadas de nuevos casos de cáncer para 2019 en España son de 277.234 casos, de los cuales 29.503 serán nuevos casos de cáncer de pulmón, por detrás de los tumores colorectales, de próstata y mama. Actualmente, el cáncer de pulmón es un 60% más frecuente en varones que en mujeres, aunque se prevé un aumento de la incidencia en ambos sexos en los próximos años, con hasta 35.000 nuevos casos esperados para 2025, y más de 40.000 en 2035. En relación con la tasa de mortalidad en este país, en 2018 se produjeron 22.896 muertes (datos obtenidos del estudio *Las Cifras del Cáncer en España 2019*, llevado a cabo por la Sociedad Española de Oncología Médica) [68].

El principal factor de riesgo del cáncer de pulmón es el tabaco, que es el causante de la enfermedad en el 90% de los pacientes (85% fumadores o exfumadores y 5% fumadores pasivos) [66]. Además, su aparición también está estrechamente relacionada con la inflamación crónica de la EPOC, frecuentemente también producida por el tabaco [69][70].

En cuanto a su pronóstico, si se tienen en cuenta todos los estadios de cáncer de pulmón, la supervivencia libre de progresión a los 5 años es, aproximadamente de un 19% y, si solo se incluyen los estadios avanzados, la supervivencia es de un 5%. El principal motivo de esta baja supervivencia es que el cáncer de pulmón se diagnostica frecuentemente en estadios avanzados, con escasas opciones terapéuticas curativas. Sólo el 20% de los pacientes se diagnostican en estadios tempranos, cuando pueden ser

resecados y aun así, tras la cirugía, el 50% sufren recidivas [71].

A pesar del desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, especialmente los tratamientos dirigidos a dianas específicas y la inmunoterapia, la supervivencia global sigue siendo escasa. Por ello, es necesario seguir investigando sobre nuevas estrategias terapéuticas y nuevos biomarcadores predictivos que guíen la elección del mejor tratamiento para cada paciente. Además, es muy importante desarrollar nuevos biomarcadores diagnósticos y técnicas de diagnóstico más sensibles, que permitan detectar la enfermedad en estadios más tempranos. Por otro lado, la prevención del tabaquismo tendría un gran impacto en la morbi-mortalidad asociada al cáncer de pulmón.

Según sus características histológicas, el cáncer de pulmón se clasifica en dos grupos: el cáncer de pulmón microcítico y el cáncer de pulmón no microcítico, representando un 13% y un 81% de los carcinomas de pulmón respectivamente. Además, con una prevalencia de un 6% se encuentran otros subtipos tumorales, que pueden englobar tumores con características propias de más de un tipo histológico tumoral [71]. A su vez, el cáncer de pulmón no microcítico se divide en 3 subtipos histológicos [72]:

- **Adenocarcinoma:** es el subtipo más prevalente, representando aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer no microcítico de pulmón. Tiene su origen en el epitelio alveolar o en las glándulas mucosas bronquiales y suele localizarse periféricamente. Su diseminación ganglionar es escasa, aunque suele diseminarse a distancia precozmente.
- **Carcinoma escamoso:** presenta una prevalencia aproximada del 35% de los casos y es el más asociado al hábito tabáquico. Se origina en el epitelio de revestimiento bronquial y presenta áreas queratinizadas y necrosis. Suele tener localización central, además de afectar sobre todo a los lóbulos superiores. Este subtipo disemina con frecuencia a los ganglios linfáticos, pero es el que presenta menor diseminación a distancia.
- **Carcinoma de células grandes:** representa el 15% de los pacientes. Se desarrolla en la periferia del pulmón. Es un tipo tumoral frecuentemente agresivo.

2.2. Biología molecular del cáncer de pulmón y terapias dirigidas

El cáncer de pulmón es una enfermedad muy heterogénea a nivel molecular [73]. En los últimos años se han identificado alteraciones moleculares esenciales en el desarrollo de este tipo tumoral gracias al avance de las nuevas tecnologías de secuenciación y al análisis de datos masivos [74]. Estos estudios han permitido la caracterización de amplias

cohortes de pacientes, que han ayudado a clasificar molecularmente los tumores [75][76].

Las alteraciones genéticas más importantes en el adenocarcinoma, ya sea por su incidencia o por la existencia de inhibidores específicos, se resumen en la figura 4 y se detallan a continuación.

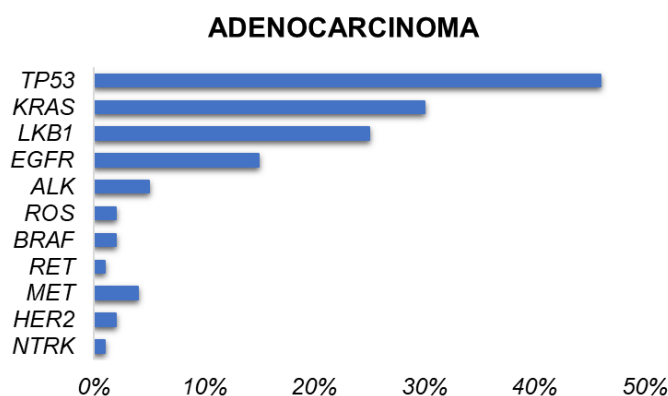


Figura 4. Frecuencia de las alteraciones más relevantes descritas en adenocarcinoma de pulmón. Las alteraciones moleculares más frecuentes en pacientes con adenocarcinoma se dan en los genes TP53, KRAS y LKB1. Otras alteraciones en los genes *EGFR*, *ALK*, *ROS*, *BRAF*, *RET*, *MET*, *HER2* y *NTRK* cobran importancia debido a que son dianas terapéuticas para inhibidores específicos.

Teniendo en cuenta su incidencia, las 3 alteraciones moleculares más relevantes en cáncer de pulmón son las siguientes:

- **TP53:** Este gen codifica para una fosfoproteína nuclear p53 (*Tumor Protein p53*), que identifica regiones de daño en ADN y se une a ellas, actuando como factor de transcripción para genes de reparación y respuesta al daño y otros genes. En cáncer de pulmón, las mutaciones inactivadoras en *TP53* aparecen en el 46% de los adenocarcinomas y en el 91% de los carcinomas escamosos. No existen tratamientos dirigidos por tratarse de un gen supresor de tumores [77].
- **KRAS:** *KRAS* (homólogo al oncogen viral de sarcoma de rata Kirsten V-Ki-Ras2) pertenece a la familia de proto-oncogenes de *RAS* (*KRAS*, *NRAS* y *HRAS*) y codifica para una proteína G. Esta proteína activa rutas como la de las MAP quinasas (*RAS/RAF/MEK/ERK*) y *PI3K/AKT*. Las mutaciones activadoras del oncogen *KRAS* ocurren con una frecuencia del 30% en los pacientes con adenocarcinoma, siendo mucho menos frecuentes en el resto de subtipos histológicos. Las mutaciones suelen ocurrir en los codones 12, 13 y 61, y los genotipos G12C y G12V son los más frecuentes [78]. Aunque es el gen más frecuentemente mutado en el adenocarcinoma de pulmón y en muchos otros tumores, todavía no se dispone de tratamientos dirigidos efectivos. Esto es debido, entre otros motivos, a que la mutación afecta al dominio de unión a GDP/GTP, el

cual tiene una afinidad muy elevada por sus ligandos y es muy difícil encontrar otra molécula que compita con ellos. Sin embargo, se ha conseguido inhibir eficazmente *KRAS* mutado en G12C con inhibidores covalentes específicos frente a esta forma mutada [79].

- **LKB1:** El gen *LKB1* (quinasa hepática B1) codifica para una proteína serina-treonina quinasa, la cual inhibe a la proteína mTOR. En cáncer de pulmón, hay diversas mutaciones somáticas que dan lugar a una proteína LKB1 truncada e inactiva. Esto puede llegar a ocurrir en un 25% de los adenocarcinomas [80]. No existen inhibidores específicos en clínica, puesto que es un gen supresor de tumores, pero las mutaciones en *LKB1* condicionan la respuesta a determinados tratamientos, como los que bloquean a PD1/PDL1 [81].

Además, existen otras alteraciones genéticas que, aunque son menos frecuentes que las anteriores, cuentan con fármacos aprobados para su uso en clínica y se describen a continuación:

- **EGFR:** *EGFR* (receptor del factor de crecimiento epidérmico) codifica una proteína transmembrana con un dominio intracelular tirosina quinasa. Cuando su ligando (EGF) se une al receptor, activa las rutas PI3K/AKT, RAS/ERK y JAK/STAT. Las mutaciones activadoras en *EGFR* son excluyentes con las mutaciones en *KRAS* y ocurren en un 15% de los adenocarcinomas. Las mutaciones o deleciones más comunes de *EGFR* ocurren en los exones del dominio tirosina quinasa, sobre todo en el exón 19 (delE746-A750) y en el exón 21 (L858R). Otras mutaciones relevantes son las que ocurren en el exón 20 (T790M), observada en el 50% de los pacientes que desarrollan resistencia a inhibidores tirosina quinasa (TKIs). Actualmente existen varios inhibidores de EGFR eficaces (erlotinib, gefitinib, afatinib y osimetinib), que se utilizan como primera línea de tratamiento en los pacientes con adenocarcinoma de pulmón *EGFR* mutado [82].
- **ALK:** ALK (quinasa de linfoma anaplásico) es una proteína tirosina quinasa, activadora de las rutas PI3K/AKT, JAK/STAT y RAS/MAPK. Su alteración más común consiste en la translocación que da como resultado su fusión con el gen *EML-4*, produciendo una ganancia de función. Las translocaciones de *ALK* tienen una incidencia del 5% en pacientes con adenocarcinoma. Generalmente, es una alteración excluyente con mutaciones en *KRAS* y *EGFR*, aunque se ha descrito también su co-existencia con mutaciones en *EGFR* en casos de resistencia a TKIs. Las resistencias al inhibidor crizotinib, han dado lugar al desarrollo de otros inhibidores de segunda generación de ALK como son ceritinib y alectinib, además de otros de tercera generación como brigatinib y lorlatinib [83][84].

- **ROS:** El protooncogen *ROS1* (c-ros oncogen 1) codifica para un receptor tirosina quinasa. Su señalización se produce a través de las rutas PI3K/AKT, JAK/STAT3 y RAS/MAPK. La alteración genética habitual consiste en la fusión con otros genes como *FIG*, *KDEL2*, *TPM3*, *SDC4*, *LRIG3*, *EZR*, *SLC34A2* y *CD74*. Esta fusión ocurre en el 2% de los casos de adenocarcinoma. Al tener mucha homología con la quinasa ALK, los inhibidores TKIs, como crizotinib, resultan eficaces para estos pacientes [85].
- **BRAF:** Este gen codifica para una proteína serina/treonina quinasa (serina/treonina proteína quinasa BRAF), efectora de la proteína KRAS y activadora de las MAP quinasas. Un 2% de los casos de adenocarcinoma presentan mutaciones activadoras en *BRAF*, que se producen en el exón 15 (V600E y D594G) y el 11 (G469A) [86]. Su relevancia radica en la posibilidad de su uso como diana terapéutica. Inhibidores específicos dirigidos utilizados en la práctica clínica son vemurafenib y encorafenib [87].

Otras alteraciones en cambio, no cuentan con fármacos aprobados en la actualidad para su uso, pero se encuentran bajo ensayos clínicos, con resultados prometedores:

- **RET:** El proto-oncogen *RET* codifica una proteína tirosina quinasa. La fusión más común de *RET* se produce con *KIF5*. Las alteraciones en *RET* solo aparecen en un 1% de los pacientes con adenocarcinoma pero hay varios inhibidores multiquinasas (cabozatinib, vandetanib y levatinib) que presentan buenos resultados en pacientes [88]. Además, también hay inhibidores específicos para RET como Loxo-292 y Blu-667 en ensayos clínicos [89][90]
- **MET:** el proto-oncogen *MET* (receptor del factor de crecimiento hepatocitario) codifica para la expresión de un receptor con actividad tirosina quinasa. Tras la unión a su ligand activa las rutas de señalización RAS/ERK, PI3K/AKT y c-SRC. La amplificación de *MET* se ocurre en el 4% de los pacientes con adenocarcinoma. Adicionalmente, también tienen relevancia las mutaciones en el exón 14 que están presentes en el 1% de los pacientes y provocan la acumulación de la proteína por déficit de degradación. Además, es uno de los mecanismos de resistencia adquirida a inhibidores EGFR-TKI, ocurriendo en el 10-20% de los casos. Los inhibidores específicos para pacientes con mutaciones en *MET* son capmatinib, tepotinib y lizotinib [91][92].
- **HER2 (*erbB-2*):** HER2 es un receptor tirosina quinasa, perteneciente a la familia de receptores de ERBB que activa las rutas PI3K/AKT, RAS/ERK y JAK/STAT. La activación oncogénica de *HER2* suele producirse por inserciones en el exón 20.

Su prevalencia es de aproximadamente un 2% de los casos de adenocarcinomas [93]. Su inhibidor es trastuzumab [94].

- ***NTRK***: Los genes *NTRK* (receptor de tirosina quinasa neurotrófico), *NTRK1*, *NTRK2* y *NTRK3*, codifican para la expresión de las proteínas TRKA, TRKB y TRKC respectivamente. Los reordenamientos genéticos en estos genes pueden dar lugar a oncoproteínas de fusión que favorecen la proliferación y la supervivencia de células en diversos tipos de tumores [95]. Se trata de mutaciones poco frecuentes, apareciendo en menos del 1% de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, aunque su inhibidor (larotrectenib) está siendo eficaz en el tratamiento de pacientes [96].

3. CITOQUINAS DE LA FAMILIA DE LA INTERLEUQUINA-6

Como ya se ha mencionado en el apartado 1.2, las citoquinas juegan un papel muy relevante en los tumores cuya aparición está relacionada con la inflamación, como es el caso del cáncer de pulmón asociado al tabaco. Entre estas citoquinas, cabe destacar el papel de la familia de la interleuquina-6 (IL-6).

3.1. Características estructurales, de señalización y funcionales de la familia de la IL-6

La IL-6 es una de las citoquinas con papel oncogénico mejor caracterizadas. La mayor parte de los miembros de la familia de la IL-6 tienen un receptor de membrana específico de unión al ligando y una subunidad efectora. En las proteínas de la familia la subunidad efectora es, en todos los casos excepto en el de la IL-31, la proteína GP130 (glicoproteína 130). Las citoquinas de la familia de la IL-6 son: IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, LIF (factor inhibidor de la leucemia), OSM (oncostatina-1), CNTF (factor neurotrófico ciliar), CT-1 (cardiotropina-1) y CLCF1 (factor similar a la cardiotropina 1). Todas ellas señalizan a través de las rutas JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT [97][98][99][100][101] (Figura 5). Aunque activen las mismas rutas, cada citoquina presenta diferencias en su función o en los efectores finales que activan, que son dependientes del tejido, del nivel de expresión del receptor y de la magnitud de la inducción [102] [103] [104].

Entre todas las proteínas de esta familia, IL-6 e IL-11 han sido las más estudiadas en su relación con el cáncer, ya que son comúnmente expresadas en tumores sólidos. Estas citoquinas, son las dos únicas de la familia que pueden utilizar homodímeros de GP130 [97][105]. Así, se forman hexadímeros cuando dos moléculas de ligando se unen a dos

subunidades transmembrana del receptor alfa y éstos a dos moléculas GP130. El resto de proteínas de la familia, a excepción de la IL-31, transmiten su señal activadora gracias a heterodímeros de subunidades específicas con GP130. IL-31 tiene un receptor compuesto por un heterodímero del receptor alfa específico de IL-31 y el receptor beta de OSM (Figura 5) [106][107].

Cada citoquina se une a la subunidad específica de su receptor, pero también pueden unirse a otros receptores específicos de otras citoquinas. Es el caso del receptor de LIFR, al que además pueden unirse CT-1 y OSM. También se ha descrito una interacción, aunque débil y poco frecuente, de CNTF con el receptor de IL-6 [100] y no se descartan más interacciones no descritas en la actualidad. Tras la unión de GP130 con la subunidad específica del receptor, se dispara la activación de las vías de señalización JAK/STAT, RAS/MAPK y PI3K/AKT (Figura 5).

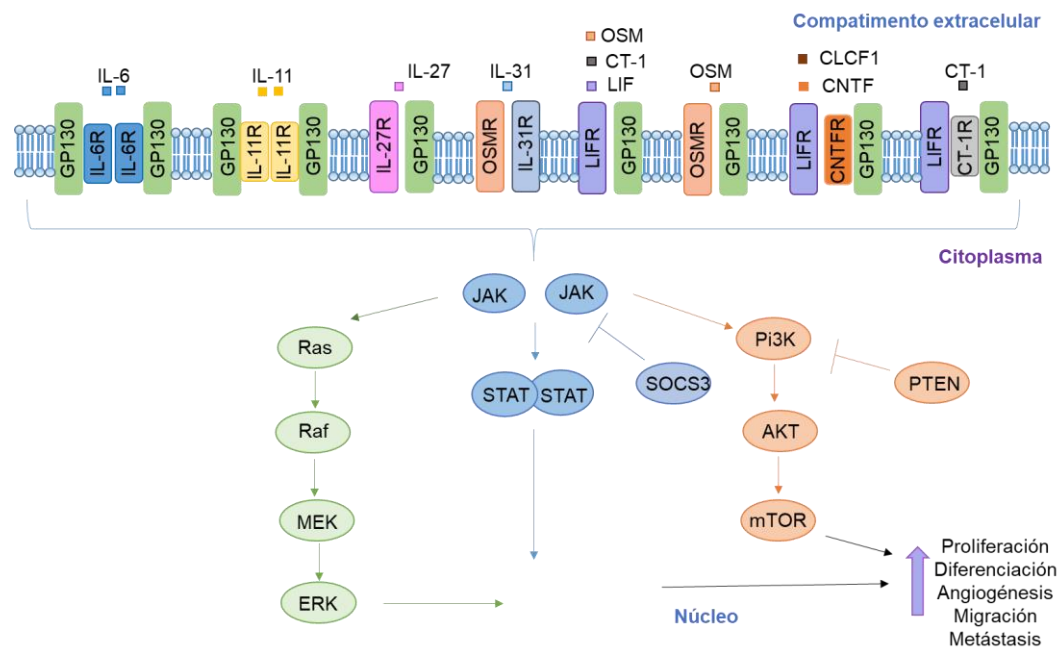


Figura 5. Señalización de las citoquinas de la familia de la IL-6. La familia de la IL-6 está compuesta por citoquinas que en su mayoría tienen una subunidad efectora y comparten la subunidad efectora de su receptor, la proteína GP130. Todos los receptores son proteínas transmembranas que, tras la unión de su ligando, desencadenan la activación principalmente, de tres rutas de señalización: JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT, promoviendo diferentes propiedades tumorigénicas.

Tras la unión del ligando al receptor se produce la dimerización de la proteína GP130, a la cual se encuentran unidas las proteínas de la familia JAK (JAK1, JAK2 y TYK2). Cuando las proteínas JAK se encuentran próximas, se induce su *cross*-fosforilación y se activan. Éstas activan a su vez a GP130 por fosforilación en los residuos Y759, Y767, Y814, Y905 e Y915, creando sitios de unión para los dominios SH2 de las proteínas STAT (STAT1, STAT3) (*signal transducer and activation of transcription 1/3*). A continuación, las

proteínas JAK activadas también fosforilan a las proteínas STAT, las cuales pueden formar homodímeros y heterodímeros que se translocan al núcleo, donde realizan su función como factores de transcripción [108][109]. Existe una retroalimentación negativa mediante la expresión de la proteína SOCS3 (supresor de la señalización por citoquinas 3), inducida por STAT3. Este inhibidor puede unirse a GP130 y a los dominios catalíticos de las proteínas JAK, inhibiendo su actividad [110]. La ruta JAK/STAT favorece los procesos de supervivencia, proliferación, diferenciación, angiogénesis, y migración [111][112][110], jugando un papel relevante tanto en las células tumorales como en el microambiente tumoral [104].

Tras la fosforilación de GP130 también se pueden crear sitios de unión SHP2 para la activación de la cascada de las proteínas RAS/ERK. Así, RAS activa a las proteínas RAF y éstas fosforilan a MEK1 y MEK2, que finalmente fosforilan a ERK1/2 (p42/p44) [110]. ERK1/2 fosforilada se transloca al núcleo para activar a otros factores de transcripción que regularán la expresión de genes involucrados en proliferación y ciclo celular [113][114].

La unión de IL-11 a su receptor también produce la activación de la vía PI3K/AKT. Aunque esta vía se activa de forma independiente a la señalización por GP130, la quinasa PI3K puede unirse a esta proteína a través de los dominios SH2 de su subunidad reguladora, p85, e inducir la activación de su subunidad catalítica, p110. PI3K activada fosforila al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), que pasa a ser fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), el cual recluta a la proteína AKT hacia la membrana, donde es también fosforilada por la quinasa PI3K. La activación de AKT promueve la activación de la vía de mTOR entre otras, y tiene implicación en procesos de proliferación, apoptosis, angiogénesis y metástasis [115]. Uno de los principales reguladores de esta ruta es la fosfatasa PTEN, que defosforila PIP3 a PIP2, disminuyendo así la activación de AKT [116][117].

Además de la señalización a través de GP130, existe una señalización alternativa, denominada *trans*-señalización, utilizada sobre todo por IL-6, pero también por IL-11 y CNTF. En esta ruta, las células secretan formas solubles del receptor y las citoquinas se unen a él. Así, la forma soluble del receptor puede interactuar con GP130 y activar las vías de señalización en células que carecen del receptor específico de membrana para la citoquina en cuestión [118]. IL-6 utiliza la señalización en *trans* como uno de los principales mecanismos de señalización en numerosas enfermedades crónicas y diversos tipos de tumores [119][120].

3.2. Papel de la familia de la IL-6 en el cáncer

Las proteínas de la familia de la IL-6 juegan un papel importante en procesos de inflamación crónica, autoinmunidad, infecciones y cáncer. Algunas de las proteínas, como la IL-6, IL-11, IL-27, LIF y OSM, han demostrado actuar como biomarcadores diagnósticos, pronósticos o predictivos de respuesta a terapias [121][122][123].

El papel que las citoquinas de la familia de la IL-6 ejercen en cáncer puede ser por efecto directo sobre las células tumorales, actuando en sus capacidades de proliferación, supervivencia, metabolismo energético, migración, invasión y metástasis [121][124] o por efecto indirecto, sobre otras células del microambiente tumoral, modulando la inflamación, la inmunosupresión y la angiogénesis [125][126] (Figura 6).

3.2.1. Efecto de la familia de la IL-6 sobre las células tumorales

La IL-6 es una de las proteínas más estudiadas en relación con el cáncer. Su potencial oncogénico está ligado principalmente a su capacidad de activar a la proteína STAT3. En este sentido, IL-6 potencia la transcripción de diversos genes relacionados con la progresión del ciclo celular y la supervivencia, como son ciclina D1, MYC, BCL-XL y survivina, además del microARN miR-21. Esta interleuquina también activa la angiogénesis, la invasión y la metástasis, a través de la expresión de genes como HIF-1, MMP2, MMP7, MMP9 y VEGF [97][127]. En estadios tardíos, IL-6 promueve la EMT induciendo la transcripción de activadores como SNAI1 y TWIST [128]. Además, IL-6 puede inducir la auto-renovación y expansión de las células madre cancerígenas mediante la activación de la proteína NANOG, contribuyendo a la resistencia a diferentes fármacos [129].

Por otra parte, IL-11, LIF y OSM muestran efectos pro-tumorales similares a los descritos en el caso de IL-6 en diferentes tipos de tumores, como el carcinoma gástrico [130], el colorectal [131][132] y el de mama [133], a través de la actuación de las rutas JAK/STAT y PI3K/AKT. Además, la activación de estas rutas por OSM y LIF han demostrado producir resistencia a terapia en cáncer de mama y de pulmón [134] [135]. También se ha descrito la acción pro-tumoral de la IL-31 en algunos linfomas [136].

A pesar de que todas estas proteínas comparten las mismas vías de señalización, algunas de ellas pueden ejercer también efectos anti-tumorales en algunos tipos de tumores. IL-27 y OSM han demostrado tener propiedades anti-tumorales en mieloma múltiple y cáncer de pulmón, alternando el balance existente entre las proteínas STAT1 y STAT3, y disminuyendo la proliferación en el caso de IL-27 [137], y el proceso de

metástasis en el caso de OSM [138].

3.2.2. Efectos de la familia de la IL-6 sobre otras células del microambiente tumoral

Las citoquinas de la familia de la IL-6, y en especial la propia IL-6, pueden promover la inflamación crónica, favoreciendo así la angiogénesis y suprimiendo la actividad anti-tumoral de los linfocitos cooperadores T_H1 [139]. La IL-6 puede, además, inducir la generación de células cooperadoras T_H17 , que tienen fenotipo pro-inflamatorio y de MDSCs, así como la supresión de células citotóxicas $CD8^+$ [140] y T_{reg} (linfocito T regulador), responsables del mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune [141]. Teniendo en cuenta su acción frente a los macrófagos, favorece el cambio fenotípico de macrófagos de tipo M1 (anti-tumorales) a M2 (pro-tumorales), con un patrón secretor que modifica el microambiente favoreciendo el crecimiento tumoral [142][110]. Se piensa que otras citoquinas de la familia pueden tener efectos similares, aunque se necesitan más estudios para corroborarlo. Un ejemplo es el de IL-11, que se sabe que promueve la tumorigénesis asociada a la inflamación en el tracto gastrointestinal [131][143] y comparte la capacidad con IL-6 de inducir la generación de células T_H17 [142]. La IL-6 también modula las funciones de los fibroblastos en el tumor, aumentando la liberación de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que favorecen la proliferación, la angiogénesis y la migración [43].

Recientemente LIF ha sido descrita como una molécula quimioatrayente de TAMs que, además, modula la expresión de algunas citoquinas como CXCL9. Esta quimioquina actúa como quimio-atrayente de células $CD8^+$ y su expresión es bloqueada por LIF. De este modo, tumores con alta expresión de LIF presentan un menor reclutamiento de células citotóxicas [144].

Al contrario que las citoquinas anteriores, IL-27 tiene actividad anti-tumoral en el microambiente favoreciendo el fenotipo M1 en los macrófagos, la supresión de las MDSCs, la activación de linfocitos T citotóxicos $CD8^+$ y la acción de células *natural killer* [145].

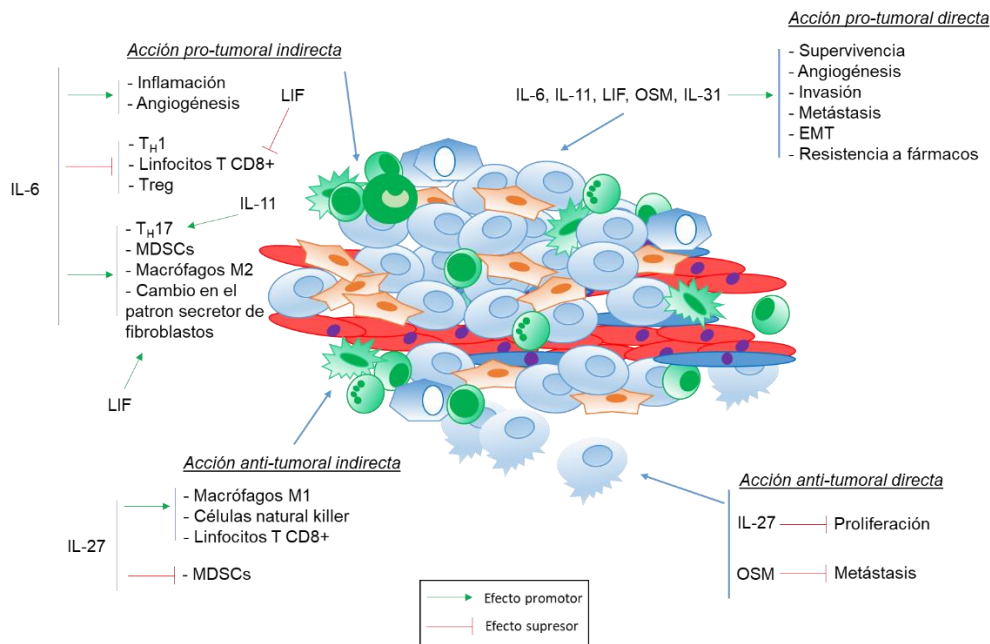


Figura 6. Efectos directos e indirectos en el tumor de las citoquinas de la familia de IL-6. Durante la tumorigénesis, la liberación de citoquinas puede tener efectos sobre las células tumorales (acción directa) y/o sobre otras células del microambiente tumoral, como fibroblastos y células inmunes (acción indirecta). Dichos efectos son, en su mayoría, pro-tumorales, a excepción de la IL-27, cuyo papel anti-tumoral está ampliamente descrito.

3.2.3. Citoquinas como estrategia terapéutica

Las citoquinas son moléculas pleiotrópicas, presentes en todo el organismo, que ejercen un papel fisiológico relevante y, por tanto, pueden ser utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades, y a su vez pueden ser dianas terapéuticas. Los tratamientos que utilizan a las citoquinas como dianas terapéuticas pueden ser de diferentes tipos:

- Anticuerpos neutralizantes de la citoquina o de su receptor, que se unen a sus proteínas diana e inhiben la activación de sus vías de señalización [146].
- Moléculas pequeñas, que compiten por afinidad con la citoquina a su unión con su receptor [147].
- Receptores *decoy*, que se unen a la citoquina e impiden su unión a su receptor [148].
- Citoquinas trampa o *traps*, que son proteínas recombinantes que se unen a receptores de membrana de citoquinas y a la porción Fc de la inmunoglobulina G1 [149].
- Fármacos peptidomiméticos, que tienen como dianas terapéuticas receptores de membrana y que llevan conjugadas moléculas que inducen apoptosis celular [150].
- Inmunoterapia con células T con receptor de antígeno quimérico o CAR (*chimeric*

antigen receptor), que son linfocitos T modificados genéticamente para reconocer a los receptores de citoquinas, que son expresados por las células tumorales, y así facilitar su eliminación por el sistema inmune [151].

Actualmente hay varios ensayos clínicos cuyas dianas son las proteínas de la familia de la IL-6 para el tratamiento de varias enfermedades de carácter inflamatorio e inmunitario, aunque todavía son pocos los medicamentos aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*). La IL-6, es la diana terapéutica más utilizada de esta familia. Por un lado, se han desarrollado varios anticuerpos para el tratamiento de enfermedades como la artritis reumatoide [152][153]. Por otro lado, en relación con el cáncer, hay ensayos clínicos en fase I/II que han evaluado la eficacia de tocilizumab, clazakizumab y siltuximab en cáncer de próstata, mama, pulmón y mieloma múltiple [154][155]. Aunque en estos estudios se ha comprobado que la eficacia del tratamiento es limitada, se están investigando biomarcadores predictivos de respuesta que ayuden en la correcta selección de los pacientes que podrían beneficiarse de estas terapias. Por otro lado, se está estudiando la posibilidad de usar estos tratamientos para contrarrestar los efectos adversos de la inmunoterapia, que se deben en parte a la desregulación en los niveles de citoquinas [156][157].

En el caso de la IL-11 aún no hay fármacos aprobados que se utilicen para el tratamiento del cáncer en la clínica, aunque se están realizando ensayos preclínicos con diferentes anticuerpos bloqueantes, que han demostrado tener eficacia en carcinoma de mama [158] y de pulmón [159], y con antagonistas como la muteína, que ha demostrado tener eficacia en tumores colorectales [143]. El receptor específico de IL-11, IL-11RA, también se ha estudiado como diana terapéutica en modelos preclínicos, existiendo un anticuerpo neutralizante para cáncer de endometrio [146][160], una molécula peptidomimética (BMTP11) [150][161] y células T con CAR, que inducen la apoptosis y la eliminación de células que expresan IL-11RA [151].

Por último, otra estrategia a seguir para inhibir las rutas activadas por las citoquinas mencionadas es adoptar como diana terapéutica la subunidad efectora de los receptores de las mismas, GP130 [162]. Investigaciones preclínicas en cáncer de ovario han demostrado que un inhibidor de GP130 disminuye el crecimiento tumoral en modelos *in vivo* [163]. En cáncer de páncreas se ha visto que el bazedoxifeno, un modulador estrogénico usado para el tratamiento de la osteoporosis, puede unirse a GP130 inhibiéndola, disminuyendo la apoptosis y aumentando el crecimiento tumoral [164].

Una de las ventajas de utilizar las citoquinas como dianas terapéuticas es que, debido a que son moléculas con un papel modulador relevante en el microambiente tumoral, en

ocasiones la inhibición de una redonda en la inhibición de otras. Este puede ser el caso de la inhibición de IL-1 β , que se está ensayando en clínica para el tratamiento de cáncer de pulmón [148][165][166]. La inhibición de IL-1 β se puede realizar mediante anticuerpos neutralizantes (canakinumab), receptores con efecto decoy (IL-1RII), inhibidores de la caspasa-1 (proteasa esencial para la activación de IL-1 β) o mediante citoquinas *traps* [166]. Debido a que IL-1 β induce la secreción de otras citoquinas, entre ellas IL-11 [167] e IL-6 [168], inhibiendo a la primera se podría conseguir disminuir la secreción de las otras.

4. INTERLEUQUINA-11 Y SU RELACIÓN CON INFLAMACIÓN Y CÁNCER

4.1. Características de la IL-11 y su receptor específico IL-11RA

La proteína IL-11 fue descubierta en 1990, en estudios con células estromales derivadas de la médula ósea. Hoy se sabe que es secretada por múltiples tipos celulares, como osteoblastos, sinoviocitos, fibroblastos, condrocitos y trofoblastos. Se trata de una proteína pequeña, de un peso molecular de aproximadamente 19KDa, codificada por un gen de 7kb, con 5 exones codificantes, localizado en el cromosoma 19q13. Su estructura proteica resuelta por cristalografía, muestra que es una proteína tipo-1, con un paquete de 4 hélices monoméricas [169]. Aunque, a nivel de ARNm, IL-11 es detectada de forma ubicua, es difícil detectar esta citoquina a nivel proteico en tejidos sanos. En condiciones fisiológicas normales se han detectado niveles bajos de IL-11 en timo, bazo, hueso, corazón, pulmón, tracto genito-urinario, riñón, cerebro, médula espinal, testículo, útero y ovario de ratón [170][107]. Sin embargo, la secreción de IL-11 aumenta en determinadas patologías incluidos procesos inflamatorios debidos a infecciones por virus, artritis [102] y diversos tipos de cáncer, como el colorectal [35], gástrico [171], de endometrio [172] y de pulmón [59].

En la mayoría de los tejidos, las principales fuentes de IL-11 son las células epiteliales y los fibroblastos, los cuales pueden aumentar la secreción de IL-11 por estimulación con TGF- β , IL-1 β , IL-22, IL-17F, IFN- γ o TNF- α [110][107]. Otros estudios describen que, en enfermedades como el cáncer, la expresión de COX-2 [173] y mutaciones en *KRAS* inducen la secreción de IL-11 en células epiteliales [174]. La existencia de tantos estímulos diferentes para la producción de IL-11 sugieren que exista una regulación compleja de su secreción, que está influenciada por el microambiente específico del tejido en estudio.

En cuanto a sus funciones, IL-11 ha sido descrita como una citoquina con capacidad trombopoyética, que participa en la formación de plaquetas, y de ahí que fuera aprobado su uso como medicamento para prevenir la trombocitopenia asociada a tratamientos con quimioterapia [175][176][177]. Además, IL-11 participa en diferentes funciones biológicas como por ejemplo la estimulación de la eritropoyesis, la activación de megacariocitos, la modulación de diversos fenotipos neuronales, la regulación de los precursores de macrófagos, la promoción del desarrollo de células madre, la formación de la placenta y la proliferación y diferenciación de osteoblastos [102].

En relación con la inflamación, se conoce que IL-11 puede tener un papel dual como citoquina pro y anti-inflamatoria. En relación a sus funciones pro-inflamatorias, IL-11 tiene un papel fundamental en la fibrosis cardiovascular y pulmonar [178][179]. En modelos animales, la inhibición de IL-11 con un anticuerpo neutralizante impidió la fibrosis en pulmón, lo que sugiere su uso como diana terapéutica para esta enfermedad. En relación con otras patologías, IL-11 puede promover la diferenciación de células T CD4⁺ a T_H17, contribuyendo a la respuesta inflamatoria de enfermedades como la esclerosis múltiple [142]. También se ha descrito que promueve el crecimiento de mastocitos, contribuyendo a la hiperplasia de estas células típica de patologías inflamatorias de la piel [180]. En cuanto a su función anti-inflamatoria, en el epitelio bronquial, la sobre-expresión de IL-11 puede suprimir la inflamación dependiente de antígeno, que es esencial para la sensibilización a alérgenos [102]. Además, este papel anti-inflamatorio es clave en la mucositis inducida por quimioterapia, la isquemia intestinal aguda y la toxicidad intestinal producida por *Clostridium difficile* [110][181].

Cuando IL-11 se une a su receptor se activan las vías de señalización, descritas en el apartado 3.1, y se producen cambios en la expresión de diferentes genes como por ejemplo, el aumento de la expresión de la proteína survivina, mediado por STAT3, con función anti-apoptótica descrita [182]. Además, IL-11 puede ser un estímulo para la expresión de TNF- α o HIF1 α , así como para una disminución de la expresión de IL-12, IL-1 β o IFN- γ [110].

Con respecto a la subunidad específica del receptor de IL-11, IL-11RA, es una proteína transmembrana de unos 55KDa, codificada por un gen de 10kb, que contiene 13 exones y se encuentra en el cromosoma 9p13. La proteína tiene dos isoformas, una con un pequeño dominio citoplásmico y la otra que carece de él, demostrando que el complejo IL-11/IL-11RA podría funcionar por *trans*-señalización. Sin embargo, hasta el momento, los transcritos solubles de IL-11RA solo han sido identificados en ensayos *in vitro* [183].

Los factores que contribuyen a la regulación de la expresión de IL-11RA no están

claros por el momento, aunque está descrito que el gen contiene secuencias de unión a factores de transcripción como P53 y AP-1. Respecto a su distribución, en ratón, el receptor de IL-11 se encuentra en cerebro, hueso, bazo, timo, vejiga, corazón, pulmón, riñón, músculo, glándulas salivares, tracto genito-urinario, útero, ovario, testículo y un gran número de células como macrófagos, megacariocitos, células epiteliales y células [170][107].

Se han realizado diferentes estudios para determinar el efecto que IL-11 puede tener en distintos tipos de cáncer asociados a la inflamación y se ha visto que sus propiedades como citoquina pro-inflamatoria hacen que aumente la tumorigénesis en diversos tipos de cáncer, que se describen a continuación.

4.2. Papel de IL-11 en tumores asociados a la inflamación

Los primeros artículos que relacionaron IL-11 con el cáncer demostraron que esta citoquina se expresaba en células tumorales de mama, aunque no parecía aumentar las propiedades tumorigénicas de las mismas [184][185]. Se describió un posible papel pronóstico relacionado con el desarrollo de metástasis en el cáncer de mama [186] y que su silenciamiento mediante siARNs (*small interference ARN*) disminuía la capacidad de migración e invasión de las células tumorales de mama *in vitro* [158].

El primer cáncer mediado por inflamación en el que se estudió el papel de IL-11 fue el carcinoma gástrico, mediante la utilización de modelos murinos. Se utilizó un *knockin* para GP130 y *knockout* para IL-11RA ($gp130^{Y757F/Y757F}il11ra1^{-/-}$) en el que IL-11 demostró tener un papel crucial en la inflamación y en el posterior desarrollo de los tumores mediante la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 [131]. Además, se describió que IL-11 alteraba la expresión de algunas proteínas relacionadas con la proliferación (RegIII- β , RegIII- γ , Gremlina-1, Clusterina y GAS1) y promovía la aparición de lesiones premalignas gástricas [187]. Recientemente, también en carcinoma gástrico, se ha comprobado que la administración de la muteína de IL-11, un péptido antagonista capaz de unirse a IL-11RA con una afinidad 20 veces superior a la que presenta IL-11, disminuye la formación de tumores gástricos *in vivo*, apoyando el uso de IL-11 como diana terapéutica en cáncer [143]. En otro estudio, de carcinoma estomacal, se observó que la pérdida del gen supresor de tumores *LKB1* en fibroblastos del estroma tumoral se asociaba a la inducción de la inflamación incluyendo, entre otros cambios, un aumento de la producción de IL-11 por parte de las células tumorales y la activación de la proteína STAT3 [188].

En el colon, la alta expresión de IL-11 está asociada al desarrollo colitis ulcerosa, aumentando el riesgo de desarrollar cáncer [143]. Además, en un estudio sobre el papel oncogénico de TGF- β en carcinoma colorectal, se observó que esta molécula es clave para la iniciación del proceso de metastatización y que ejerce su papel promoviendo la secreción de IL-11 por parte de los fibroblastos. Esta secreción produjo efectos importantes en la formación de metástasis en modelos *in vivo*, pero no en la proliferación celular ni en el crecimiento tumoral [35].

En estudios en carcinoma de endometrio, la expresión de IL-11 se vio aumentada en el lavado endometrial de pacientes con tumores de grado 1 y 3 con respecto a pacientes sin tumor [172]. Además, se describió que IL-11 regulaba la migración y la adhesión celular mediante la activación de la proteína STAT3 *in vitro* [111][189]. El tratamiento con el anticuerpo neutralizante de IL-11RA demostró que inhibía la proliferación y la invasión tanto *in vitro* como *in vivo*, y su combinación con doxorrubicina promovía además un aumento de la apoptosis [160][146].

Respecto al cáncer de páncreas, los pacientes con tumores expresaron mayores niveles sanguíneos de IL-11 que los sanos, confirmando su papel como biomarcador diagnóstico. Paradójicamente, su presencia indicaba un mejor pronóstico ya que pacientes con metástasis y supervivencia más corta tenían niveles plasmáticos menores de esta proteína [190].

En relación al cáncer de vejiga, los pacientes con la enfermedad mostraron menor nivel de IL-11 que individuos sanos, por lo que los autores hipotetizaron con la idea de que en el contexto de este tipo de tumores el papel anti-inflamatorio de IL-11 cobra mayor importancia, disminuyendo la progresión tumoral [191].

En la próstata se observó un efecto pro-tumoral de la IL-11, favoreciendo la proliferación, reduciendo la apoptosis y aumentando la migración *in vitro* [192]. Además, BMTP-11, un fármaco peptidomimético que induce apoptosis y tiene como diana IL-11RA, ha demostrado tener eficacia en modelos *xenograft* aunque en el ensayo clínico de fase 0 se observó toxicidad renal, por lo que es necesario indagar más sobre las dosis adecuadas para pacientes [161].

En osteosarcoma, mediante técnicas *in vitro* y usando modelos animales *xenografts* se demostró que la vía de IL-11 era importante en la progresión tumoral, ya que aumentaba su proliferación e invasión. Esta progresión fue reducida mediante el uso de BMTP-11 [161][150]. En metástasis pulmonares de osteosarcoma el tratamiento con células T CAR que reconocían IL-11RA disminuyó el crecimiento tumoral en modelos *xenograft* [151].

En cáncer de pulmón, utilizando modelos murinos ($KRAS^{LA1}$) observaron que los CAFs, aislados de animales con adenocarcinoma sobre-expresaban más IL-11 en comparación con los fibroblastos normales [42]. Posteriormente, fue descrita la capacidad de la IL-11 secretada por los CAFs de conferir resistencia a cisplatino en adenocarcinoma de pulmón, mediante la activación de la proteína STAT3 [193]. En nuestro grupo hemos descrito su posible papel como biomarcador diagnóstico para pacientes con adenocarcinoma de pulmón en un estudio en el que, mediante un *array* de anticuerpos, se detectaron niveles elevados de la proteína IL-11 en muestras de lavado broncoalveolar de cohortes de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, en comparación con individuos sanos y pacientes con EPOC u otros subtipos tumorales de cáncer de pulmón, lo que nos llevó a la hipótesis de su posible papel en el adenocarcinoma de pulmón [59]. Muy recientemente, ha sido descrito el efecto pro-oncogénico de IL-11 en proliferación y migración en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón a través de la activación de las proteínas STAT3 y AKT, así como su papel como biomarcador pronóstico, en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico [159].

HIPÓTESIS

IL-11 podría jugar un papel importante en la génesis y progresión del adenocarcinoma de pulmón. Su efecto podría producirse directamente sobre las células tumorales y/o indirectamente sobre otras células del microambiente tumoral. Con estas premisas, su estudio y validación como diana terapéutica podría tener implicaciones relevantes en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en el futuro.

OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este proyecto de tesis es caracterizar el papel biológico de la IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón. Para alcanzarlo, se definieron los siguientes **objetivos específicos**:

1. Estudio del efecto oncogénico de IL-11 *in vitro* e *in vivo*.
 - Análisis del papel de IL-11 en la célula tumoral.
 - Análisis del papel de IL-11 en el microambiente tumoral.
 - Determinación del efecto de IL-11 en modelos animales.
2. Análisis del valor de IL-11 como biomarcador pronóstico.
3. Estudio de IL-11 como posible diana terapéutica en el adenocarcinoma de pulmón.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. REACTIVOS BIOLÓGICOS

1.1. Plásmidos

A continuación, se detallan los plásmidos utilizados para sobre-expresar y silenciar genes en este proyecto de tesis.

Tabla 1. Plásmidos utilizados

Nombre	Uso	Antibióticos de selección	Referencia/ Proveedor
pCMV6	Plásmido vacío, control de sobre-expresión de IL-11RA e IL-11	Ampicilina/G418	PS100001/ <i>Origene</i>
pCMV6-IL-11 (cDNA)	Sobre-expresión de IL-11	Ampicilina/G418	RC204493/ <i>Origene</i>
pCMV6-IL-11RA (cDNA)	Sobre-expresión de IL-11RA	Ampicilina/G418	RC226571/ <i>Origene</i>
pCMV3 (cDNA)	Plásmido vacío, control de sobre-expresión de IL-11 usado en co-transfecciones	Ampicilina/ Higromicina B	CV014/ <i>Sino Biological</i>
pCMV3-IL-11 (cDNA)	Plásmido de sobre-expresión de IL-11 usado en co-transfecciones con plásmidos pCMV6-IL-11RA	Ampicilina/ Higromicina B	12225/ <i>Sino Biological</i>
lentiCRISPR v2	Plásmido vacío, control de silenciamiento de IL-11	Ampicilina/ Puromicina	52961/ <i>Addgene</i>
lentiCRISPRv2-IL-11 (sgARN)	Silenciamiento de IL-11	Ampicilina/ Puromicina	Generado en nuestro laboratorio
lentiCRISPRv2-IL-11RA (sgARN)	Silenciamiento de IL-11RA	Ampicilina/ Puromicina	Generado en nuestro laboratorio
psPAX2	Empaquetador para partículas lentivirales	Ampicilina/-	12260/ <i>Addgene</i>
pMD2.G	Plásmido de expresión de VSG-G para producción de partículas lentivirales	Ampicilina/-	12259/ <i>Addgene</i>

1.2. Antibióticos de selección

Para seleccionar las bacterias transformadas con los plásmidos descritos (Tabla 1) se utilizó el antibiótico de selección ampicilina a 100 µg/ml (*Calbiochem*). En el caso de la selección en células de mamíferos, dependiendo del tipo de plásmido introducido, se llevó a cabo con G418 a 0.5 mg/ml (*Santa Cruz Biotchnology*), higromicina a 150 µg/ml (*Life Technologies*) o puromicina a 1 µg/ml (*InvivoGen*).

1.3. Cepas bacterianas

Los distintos plásmidos de sobre-expresión utilizados en este trabajo (Tabla 1) se amplificaron en la cepa competente *Escherichia coli* DH5 α *subcloning efficiency* (Thermo Fisher Scientific) y DH10B *max efficiency* (Thermo Fisher).

1.4. Sondas de PCR a tiempo real

Se realizaron ensayos de qRT-PCR para los cuales se emplearon las siguientes sondas *TaqMan* (Life Technologies) (Tabla 2).

Tabla 2. Sondas empleadas en este trabajo

Gen Diana	Referencia
IL-11	Hs00174148_m1 IL-11
IL-11RA	Hs00234415_m1 IL-11R
GP130	Hs00174360_m1 IL6ST
GAPDH	Hs99999905_m1
B2M	Hs99999907_m1

1.5. Anticuerpos

Para la detección de las proteínas de interés se utilizaron anticuerpos para las técnicas *Western Blot* (WB) e inmunohistoquímica (IHQ) (Tabla 3). En el caso de los anticuerpos utilizados en los kits de ELISA, ya venían listos, sin especificar referencia, y se añadieron siguiendo las especificaciones del proveedor (apartado 2.4.4).

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en este proyecto de tesis.

Proteína Diana	Tipo	Técnica/Dilución	Referencia/Proveedor
IL-11RA	Conejo/Policlonal	WB/1:500	Sc-130920/ <i>Santa Cruz Biotechnology</i>
IL-11RA	Conejo/Monoclonal	IHQ/1:400	Ab12515/Abcam
GP130	Conejo/Policlonal	WB/1:500	Sc-656/ <i>Santa Cruz Biotechnology</i>
pSTAT1 (Tyr 701)	Conejo/Policlonal	WB/1:1000 IHQ/1:1000	9167/ <i>Cell Signalling Technology</i>
STAT1	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	9176/ <i>Cell Signalling Technology</i>
pSTAT3 (Tyr 705)	Conejo/Policlonal	WB/1:1000 IHQ/1:1000	9145/ <i>Cell Signalling Technology</i>
STAT3	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	9139/ <i>Cell Signalling Technology</i>
pERK1/2p (Trh202/Tyr204)	Conejo/Policlonal	WB/1:1000	9101/ <i>Cell Signalling Technology</i>
pERK1/2	Conejo/Policlonal	WB/1:1000	9102/ <i>Cell Signalling Technology</i>
pAKT (Ser 473)	Conejo/Policlonal	WB/1:1000	9271/ <i>Cell Signalling Technology</i>
AKT	Conejo/Policlonal	WB/1:1000	9272/ <i>Cell Signalling Technology</i>
β -Actina	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	A5316/ <i>Sigma-Aldrich</i>
α -Tubulina	Ratón/Monoclonal	WB/1:5000	T9026/ <i>Sigma-Aldrich</i>
Ciclina D1	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	Sc-450/ <i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Ciclina D1	Conejo/Monoclonal	IHQ/1:75	M3635/ <i>Dako</i>
p21	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	Sc-6246/ <i>Santa Cruz Biotechnology</i>
BCL2	Ratón/Monoclonal	WB/1:1000	15071/ <i>Cell Signalling Technology</i>
IgG de conejo (Secundario+HRP)	Cabra/Policlonal	WB/1:10.000	7074/ <i>Cell Signalling Technology</i>
IgG de ratón (Secundario+HRP)	Caballo/Policlonal	WB/1:10.000	7076/ <i>Cell Signalling Technology</i>
IL-11	Conejo/Policlonal	IHQ/1:100	PA5-36544/ <i>Thermo Fisher Scientific</i>
Ki67	Ratón/Monoclonal	IHQ/Listo para uso	IR626/ <i>Dako</i>

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Amplificación plasmídica

2.1.1. Transformación de células quimiocompetentes

Las bacterias *E. coli* quimiocompetentes (DH5 α) se descongelaron a 4°C. Para cada transformación se utilizó una fracción de 25 μ l de una suspensión de bacterias a la cual se añadieron 5 μ l de ADN plasmídico a 100 ng/ μ l. A su vez, a una fracción de células competentes se le añadió el mismo volumen de agua estéril como control negativo de la transformación. Tras incubar estas mezclas en hielo durante 30 minutos, se les dio un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, a fin de alterar la estructura de la membrana y facilitar la entrada del plásmido al citoplasma, y se volvió a incubar la mezcla en hielo durante otros 2 minutos. Posteriormente, se añadió 1 ml de medio SOC (*Invitrogen*) a temperatura ambiente a cada vial. A continuación, los viales se incubaron en agitación durante una hora a 37°C y se centrifugaron a 3000 revoluciones por minuto (rpm), durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante, dejando solo un pequeño resto para resuspender el *pellet* celular y sembrar las células transformadas en placas con medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani con agar (LB-agar), con el antibiótico de selección apropiado (Tabla 1). Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche (O/N). Transcurrido este tiempo, se seleccionó una de las colonias y se cultivó en 5 ml de medio LB con el antibiótico de selección durante 8 horas. Pasado ese tiempo, los 5 ml con bacterias en crecimiento se añadieron a matraces con 250 ml medio LB y antibiótico de selección y se incubó O/N. Este cultivo de bacterias fue utilizado para realizar la extracción plasmídica, como se describe a continuación. Además, 1 ml del cultivo fue destinado para su criopreservación con glicerol al 10%.

2.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Se realizó usando los protocolos de Miniprep (*kit Isolate II Plasmid Mini kit, Bioline*) o MaxiPrep (*JETSTAR, Genomed*). Estos protocolos se basan en realizar una lisis alcalina de las bacterias transformadas con el plásmido de interés, seguida de la precipitación y purificación del ADN plasmídico utilizando una columna de intercambio iónico. El ADN se unió a la columna en condiciones apropiadas de pH y concentración salina. Las impurezas se retiraron haciendo lavados de la columna con una solución de carga iónica intermedia. Posteriormente, el ADN se extrajo pasando por la columna un tampón con alta concentración salina, y se precipitó por medio de la adición de isopropanol y centrifugación para concentrar el ADN y aislarlo de las sales en el tampón de elución.

Finalmente, el ADN plasmídico se lavó con etanol al 75% y se diluyó en agua milli-Q. La concentración de ADN se determinó por medición de la absorbancia con el equipo *NanoDrop™ 2000/2000c* (*Thermo Fisher Scientific*). Para su conservación, el ADN se almacenó a -20°C.

2.2. Obtención de plásmidos CRISPR con ARN guías

2.2.1. Diseño y síntesis de ARNs guías (sgARNs)

En primer lugar, se diseñaron 3 sgARNs diferentes y específicos para cada gen de interés, los cuales fueron clonados en el plásmido lentiCRISPR v2 (Tabla 7). Para ello, se introdujo la secuencia de ADN del gen de interés en la página web *Genetic Perturbation Platform* (<http://www.broadinstitute.org/ARNi/public/analysis-tools/sgARN-design>) y se eligieron las secuencias teniendo en cuenta el mayor efecto *On-Target* y el menor efecto *Off-Target*. Al obtener 3 sgARNs distintos, aumentamos la posibilidad de que alguno de ellos funcione silenciando por completo la expresión del gen diana.

Las secuencias diseñadas para los sgARNs fueron extendidas en sus extremos 5', añadiendo la combinación de oligonucleótidos necesarios para realizar el protocolo de clonaje posterior. Finalmente, se encargó la síntesis de dos secuencias de oligonucleóticos (en sentido *forward* y *reverse*) para cada uno de los 3 sgARNs elegidos (*Sigma-Aldrich*) (Tabla 4).

Tabla 4. sgARNs diseñados para silenciamiento de IL-11 e IL-11RA

Secuencia diana	sgARNs diseñados
sgRNA-IL-11-1: CGGACCTACTGTCCTACCTG	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG CGGACCTACTGTCCTACCTG3' Complementario reverso (<i>Reverse</i>): 5' AAACC AGGTAGGACAGTAGGTCCGC3'
sgRNA-IL-11-2: TGACACTTGACTGGGCCGTG	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG TGACACTTGACTGGGCCGTG3' Reverse (<i>Reverse</i>): 5' AAACC ACGGCCCAGTCAAGTGTCAC3'
sgRNA-IL-11-3: CGTGCCGCAGGTAGGACAGT	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG CGTGCCGCAGGTAGGACAGT3' Complementario reverso (<i>Reverse</i>): 5' AAACA CTGTCCTACCTGCGGCACGC3'
sgRNA-IL-11RA-1: CAGTGTCTGCTGGTTTCGGGAT	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG CAGTGTCTGCTGGTTTCGGGAT3' Complementario reverso (<i>Reverse</i>): 5' AAACC ATCCCCGAAACCAGGACACTGC3'
sgRNA-IL-11RA-2: ACCCTGGATGGTGCACTTGG	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG ACCCTGGATGGTGCACTTGG3' Complementario reverso (<i>Reverse</i>): 5' AAACC ACAAGTGCAACATCCAGGGTC3'
sgRNA-IL-11RA-3: GGGCTGTAGCCACGGCCACC	Complementario (<i>Forward</i>): 5' CACCG GGGCTGTAGCCACGGCCACC3' Complementario reverso (<i>Reverse</i>): 5' AAACC AGGGTGGCCGTGGCTACAGCCCC3'

2.2.2 Clonaje de sgARNs en un vector lentiviral

Los sgARNs sintetizados se clonaron en el plásmido lentiCRISPR v2 de la siguiente forma:

- *Digestión del plásmido pLenticrispr v2:*

El plásmido se cortó utilizando la siguiente reacción de digestión: 5 µg de plásmido pLetiCRISPR a una concentración de 1 µg/µl, 3 µl del enzima BsmB1 (NEB), 4 µl *buffer* NEB 3.1 y 28 µl agua milli-Q. Dicha mezcla se incubó durante 2 horas a 55°C y, posteriormente, 20 minutos a 80°C para inactivar la reacción enzimática.

- *Defosforilación del plásmido digerido:*

A continuación, se produjo la reacción de defosforilación del plásmido anteriormente digerido, mediante la siguiente reacción: 40 µl de plásmido disgregado, 3 µl fosfatasa antártica (NEB), 6 µl de *AP buffer* (NEB) y 11 µl de agua milli-Q. Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C y, para terminar, 5 minutos a 70°C.

- *Fosforilación y anillamiento de cada par de oligonucleótidos para cada sgARN:*

Los oligonucleótidos sintetizados (Tabla 6) fueron fosforilados y anillados tras realizar la siguiente mezcla: 1 µl de oligonucleótido *forward* (100µM), 1 µl de oligonucleótido *reverse* (100 µM), 0.5 µl T4 PNK (NEB), 10 µl de buffer T4 (NEB) y 6.5 µl de agua milli-Q. La reacción se llevó a cabo en el termociclador *S1000 Thermal Cycler* (BioRad), siguiendo los pasos de la tabla 5.

Tabla 5. Reacción de fosforilación y anillamiento de sgARNs

Temperatura	Tiempo	Función
37°C	30 minutos	Fosforilación de oligonucleótidos
95°C	5 minutos	Finalización de reacción de fosforilación
95°C→25°C (5°C/min)	14 minutos	Anillamiento de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos anillados se diluyeron diez veces (1:10) en agua destilada estéril. Esta dilución es la que se usó en el proceso siguiente de ligación.

- *Ligación del plásmido con los sgARNs:*

Para terminar con el clonaje, se realizó la siguiente reacción de ligación: 2 µl del plásmido digerido y desfosforilado, 1 µl de los oligonucleótidos fosforilados y anillados, 1 µl de ligasa T4 (NEB), 1 µl de buffer T4 (NEB), 5 µl de agua milli-Q. Dicha mezcla se incubó a 16°C, O/N.

Tras la generación de los plásmidos con los sgARNs clonados, éstos fueron amplificados siguiendo primero el protocolo de transformación (apartado 2.1.1). Así, se consiguieron colonias de bacterias transformadas con los plásmidos correspondientes y se seleccionaron 2 colonias por cada plásmido, a las cuales después se les realizó la purificación de ADN plasmídico por Miniprep, según indicaciones del fabricante (apartado 2.1.2).

Tras la purificación de los plásmidos producidos, éstos fueron secuenciados, en la unidad de genómica del CNIO, para comprobar que el ARN guía se había clonado de manera correcta.

Una vez confirmado que en las diferentes colonias los sgARNs estaban insertados correctamente, se seleccionó uno y se aisló el ADN plasmídico a mayor escala, mediante Maxiprep (apartado 2.1.2) y se conservó una alícuota en glicerol al 10%.

2.3. Análisis de la expresión génica a nivel de ARN mensajero (ARNm)

2.3.1. Extracción de ARN

Se realizó la extracción de ARN de líneas celulares, de tumores de modelos PDX (*Patient Derived Xenograft*) y de tumores de pacientes congelados. En el caso de las líneas celulares, partiendo de un cultivo con una confluencia aproximada del 60-80% en una placa de 10 cm, se eliminó el medio y se añadió 1ml del reactivo Trizol (*Life Technologies*). A continuación, se siguieron las instrucciones del fabricante. Este reactivo lisa las células y conserva el ARN, y la adición posterior de cloroformo permite la separación de la muestra en tres fases diferentes, lo que permite recuperar el ARN aislado de una de estas fases. Posteriormente, el ARN se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol al 75% y fue disuelto en agua DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato).

Para la extracción de ARN de tumores de modelos PDX, se extrajo el tumor del animal y se disgregó con el equipo *Tissuelyser* (*Qiagen*), siguiendo las instrucciones del proveedor. Posteriormente, se añadió trizol y se continuó con el protocolo mencionado anteriormente.

Por otro lado, también se realizó extracción de ARN de tejido congelado, obtenido de tumores de pacientes con adenocarcinoma del Hospital 12 de Octubre. La congelación del tejido, previa a la extracción de ARN, se realizó en OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*). Posteriormente, se disgregó en el equipo *TissueLyser* (*Qiagen*), siguiendo las especificaciones del proveedor, en el buffer de extracción del kit *RNeasy Mini Kit* (*Qiagen*). Posteriormente, la muestra disgregada se pasó a través una aguja hipodérmica 25G y se siguió con los siguientes pasos del kit de extracción. Para determinar la concentración de ARN extraído se utilizó de nuevo el equipo NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*). Para su conservación, el ARN se guardó a -80°C.

2.3.2. Transcripción reversa

Partiendo del ARN extraído de la muestra de interés, se realizó el protocolo de transcripción inversa o retrotranscripción para obtener el ADN complementario (ADNc). Para ello, se utilizó el kit de retrotranscripción *TaqMan Reverse Transcription* (*Life Technologies*), siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se utilizó 1 µg de ARN en 10 µl, con 10 µl de mezcla madre o *master mix*, en un volumen final de 20 µl, siguiendo el protocolo de retotranscripción especificado por el fabricante (Tabla 6). La reacción se llevó a cabo en el termociclador *S1000 Thermal Cycler* (*BioRad*). La concentración de ADNc resultante se midió con el equipo NanoDrop™ 2000/2000c

(*Thermo Fisher Scientific*) y se prepararon alícuotas de 25 ng/ml, que se usaron para hacer PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

Tabla 6. Protocolo de la retrotranscripción de ARN

Temperatura	Tiempo	Función
25°C	10 minutos	Apareamiento de los cebadores
37°C	120 minutos	Retrotranscripción
85°C	5 minutos	Inactivación de la enzima

2.3.3. PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Para la determinación de la expresión de ARNm se realizó qRT-PCR en el equipo CFX (BioRad), utilizando siempre 3 réplicas técnicas, según el protocolo indicado por el fabricante de la *master mix Taqman para qPCR (Thermo Fisher Scientific)*. El volumen final de cada reacción fue de 10 µl, que contenían 5 µl de la *master mix*, 2.5 µl de la sonda *Taqman* del gen en estudio (Tabla 2) y 2.5 µl de muestra de ADNc a una concentración de 25 ng/µl. Además, para cada sonda se llevó un control negativo (sin muestra de ADNc), para descartar contaminaciones. Se siguió un protocolo de termociclación de 40 ciclos (Tabla 7).

Tabla 7. Protocolo de termociclación de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real

Temperatura	Tiempo	Repeticiones	Función
95°C	10 minutos	1x	Activación de la enzima
95°C	15 segundos	40x	Desnaturalización del ADN
60°C	1 minuto		Apareamiento con los cebadores y extensión del ADN

La cuantificación relativa de la expresión de ARNm se determinó a partir de los valores Ct obtenidos en la reacción, definiendo Ct como el número del ciclo en el que se detecta señal de amplificación del gen diana por encima de un umbral predeterminado, que permite discernir entre una señal de amplificación real y ruido. Para cada muestra se calculó la media de tres replicados técnicos para cada gen, y este valor medio de Ct se normalizó con el Ct de los genes endógenos GAPDH o B2M (en líneas celulares o muestras tumorales, respectivamente), obteniéndose el valor ΔCt . Los niveles de expresión se representaron utilizando el valor $2^{-\Delta Ct}$.

2.3.4. Análisis de la expresión de ARN por ARNseq

Tras la extracción de ARN de las muestras (apartado 2.3.1), se midió la cantidad de ARN extraída con el equipo Qubit 3.0 (*Thermo Fisher Scientific*) y la calidad del mismo con el equipo *Bioanalyzer 2100* (*Agilent*).

La fracción poly(A) del ARNm se aisló del ARN total y el ADNc se obtuvo siguiendo las recomendaciones del kit de *Illumina* mediante el cual la fracción poly(A) se recogió con bolas magnéticas con oligonucleótidos poly(T) y se fragmentó químicamente. Los fragmentos de ADNc pasaron por un proceso de reparación final que consistió en la adición de una única base "A" al extremo 3' y ligación de los adaptadores. Finalmente, se realizó una purificación de los productos resultantes de la ligación y se amplificaron por PCR, para crear la librería de ADNc de doble cadena. La calidad se midió en el 4200 TapeStation (*Agilent*) y la cantidad determinada por RT-qPCR en el equipo *LightCycler 480* (*Roche*).

Para la secuenciación, antes de la generación de los grupos, se realizó la agrupación equimolar de la librería. La agrupación de la librería de ARNc se secuenció por secuenciación de extremo pareado (100x2) en el secuenciador *HiSeq 2500* (*Illumina*).

El control de calidad de los datos se realizó utilizando la herramienta *FastQC*. Las lecturas se mapearon contra el genoma humano hg38 usando *tophat2*. Las lecturas con baja calidad (puntuación phred<10) se eliminaron del análisis utilizando el software *Picard Tools*. Las predicciones genéticas se estimaron utilizando el método *EdgeR* y los niveles de expresión se calcularon utilizando el software *HT Seq* para conteos y TMM.

2.4. Análisis de la expresión a nivel proteico

2.4.1. Extracción de proteínas

Para la obtención de muestras proteicas de líneas celulares, se partió de un cultivo celular al 60-80% de confluencia en placa de 10 cm o de 6 pocillos, dependiendo del experimento. A continuación, y siempre trabajando en frío, se realizaron 2 lavados con PBS y se llevó a cabo la extracción del contenido celular añadiendo 200-500 µl del buffer de lisis RIPA (*Sigma-Aldrich*), al que se añadieron inhibidores de proteasas y fosfatasa (*Sigma-Aldrich*), siguiendo las concentraciones indicadas por el fabricante. La recogida de la muestra se llevó a cabo mediante raspado de la placa, en frío, y se agitó con vórtex cada 10 minutos, durante 1 hora. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 13.000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C, para eliminar los restos de membrana celular. Para su conservación, las proteínas se guardaron a -80°C.

En el caso de las muestras de tumores de los modelos PDX, se extrajo el tumor, se troceó, se pulverizó, utilizando mortero y nitrógeno líquido, y al pulverizado se le añadió el buffer de lisis RIPA, descrito anteriormente, y se continuó con el procesamiento descrito para las líneas celulares. El volumen de RIPA añadido cambiaba según el volumen del trozo de tumor extraído (500 µl de RIPA para tumores de 3-5 mm³).

Para la extracción proteica de muestras de organoides, se retiró el medio de cultivo de la placa y se añadieron 2 ml de la solución fría *Cell Recovery* (Corning). Tras la disolución del matrigel (BD) las células se disgregaron por pipeteo y se recolectaron en un tubo, donde se incubaron en frío durante 30 minutos. El *pellet* de células se recogió tras centrifugación a 4°C, a 1.500 rpm, durante 5 minutos y se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS frío. El *pellet* celular fue resuspendido en 200 µl de RIPA y procesado al igual que las muestras de líneas celulares y PDX.

2.4.2. Cuantificación proteica

Para la medición de la cantidad de proteína total de los extractos se añadió, en una placa de 96 pocillos, 200 µl del reactivo Bradford 1X (BioRad), mezclado con 2 µl de muestra y se midió la absorbancia a 595 nm con el equipo *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). En paralelo se midió la concentración de proteína de una curva estándar utilizando cantidades conocidas de albúmina sérica (BSA), para poder extrapolar las concentraciones de las muestras de interés.

2.4.3. Western Blot (WB)

- Preparación de muestras:

Tras la determinación de la cantidad total de proteínas de las muestras, se prepararon alícuotas de 50-100 µg de proteína total, según la proteína a analizar, y se añadió el buffer de carga *Laemmli* 5X (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.0025% (*Sigma-Aldrich*)). Las muestras se desnaturalizaron incubándolas a 95°C durante 5 minutos.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida:

Los geles de electroforesis de acrilamida se resolvieron usando el sistema *Mini-Protean Tetra Cell* (BioRad). Como patrón de peso molecular de proteínas se empleó *Precision Plus Protein Dual Color* (BioRad).

El gel separador se preparó en tampón (100 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1%), al 7,5, 10 ó 12,5% de poliacrilamida a partir de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1 40% (BioRad),

según el tamaño de las proteínas a analizar. El gel concentrador de las muestras se preparó al 5,25% de poliacrilamida en tampón (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%). Los geles se polimerizaron con APS 0,1%, usando como agente catalizador TEMED. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V, durante aproximadamente 2 horas, dependiendo del porcentaje de poliacrilamida del gel separador. Para el desarrollo de la electroforesis, se utilizó como tampón de electroforesis Tris/Glicina/SDS (*BioRad*).

- *Transferencia:*

Tras la separación proteica por peso molecular en el gel de poliacrilamida, éstas se transfirieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivilideno) (*GE Healthcare*), previamente humedecida con metanol, utilizando el sistema *Mini Trans-Blot Cell* (*BioRad*) y el tampón de transferencia Tris/Glicina (*BioRad*), con metanol al 20% (*Merck-Millipore*).

Se insertaron en un casete el gel, junto con la membrana, entre dos papeles *Wathman* empapados en tampón de transferencia, y éste se incluyó en la cubeta de transferencia. El procedimiento se llevó a cabo en condiciones constantes de amperaje (300 mA), durante 3 horas, en frío.

- *Bloqueo de membrana e incubación con anticuerpos:*

La membrana conteniendo las proteínas transferidas fue bloqueada durante 2 horas, con una solución de TBS, al 0.1% de Tween20 (*Sigma-Aldrich*) (TBST), conteniendo BSA al 2-5%, dependiendo del anticuerpo que se vaya a usar (*Labotac*). Posteriormente, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario (Tabla 3), diluido en el tampón de bloqueo, O/N, a 4°C. Al día siguiente, tras 3 lavados de 5 minutos con TBST, se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 3) diluido en el tampón de bloqueo. Finalmente, la membrana fue lavada de nuevo 3 veces en tampón TBST, y revelada con el reactivo *Clarity ECL* (*BioRad*) en un equipo *ChemiDoc XRS+* (*BioRad*).

Generalmente se cortan las membranas para incubarlas con distintos anticuerpos y visualizar proteínas de diferentes tamaños. Cuando los tamaños de las proteínas eran parecidos y no había muestra suficiente para cargar varios geles, se utilizó la técnica del *stripping*. Para ello, la membrana fue incubada durante 45 minutos de una solución 10% SDS, 0.5M TrisHCl pH6.8 y 4% 2-mercaptoetanol, y posteriormente, lavada cada 10 minutos con TBST, durante 30 minutos. A continuación, la membrana fue bloqueada de nuevo y se produjo la visualización de la nueva proteína de interés de la misma forma descrita anteriormente.

- *Cuantificación de bandas:*

Para cuantificar las bandas de proteínas de las membranas se utilizó el software *ImageLab 5.0 (BioRad)*. Se cuantificó el volumen de la banda de la proteína de interés y éste fue normalizado con el volumen de la banda correspondiente a la proteína con expresión constitutiva (β -Actina o α -Tubulina, dependiendo del ensayo).

2.4.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

2.4.4.1. ELISA de IL-11

Para la detección de la proteína IL-11 se utilizó el protocolo del kit *Quantiquine (R&D Systems)*. Para ello, se partió de cultivos celulares en una confluencia de aproximadamente el 60% a los que se les añadió 8 ml de medio completo y, tras 48 horas de incubación a 37°C, se recogió 1 ml de sobrenadante. Además, se realizó extracción proteica de las células cultivadas para, posteriormente, medir la cantidad de proteína total por el método Bradford (apartado 2.4.2) y así poder normalizar la concentración detectada de IL-11 en el sobrenadante con respecto a la proteína total celular. Cuando los sobrenadantes provenían de co-cultivos con *transwells* (apartado 3.5.4.6), se recogió el medio del compartimento inferior. También se realizaron ELISAs de lavados broncoalveolares de ratones para lo cual se extrajo el lavado (apartado 4.3.2) y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos, para eliminar restos celulares. Para su conservación, hasta el momento de realizar el ELISA, los sobrenadantes de cultivos celulares y los lavados broncoalveolares se almacenaron a -80°C. En el ELISA se utilizaron 100 μ l, tanto de los sobrenadantes de células como de los lavados broncoalveolares, y las muestras se cargaron por duplicado.

La realización del protocolo se llevó a cabo según las condiciones descritas por el fabricante del kit empleado. Con esta técnica es posible detectar la IL-11 soluble contenida en el sobrenadante de los cultivos celulares u otras muestras biológicas, resultado de la secreción celular. Dicho kit contenía además una muestra de IL-11 humana recombinante para realizar una curva estándar diluida y poder cuantificar la concentración de la muestra de interés. En primer lugar, se añadieron 100 μ l de la muestra de interés o de proteína estándar, de forma que la IL-11 soluble se uniera al anticuerpo anti-IL-11 que tamizaba la placa de ELISA. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario, que contenía conjugado el enzima responsable de la reacción colorimétrica final. Para terminar, se añadió el sustrato colorimétrico de la reacción y una solución de parada de dicha reacción. La absorbancia de las muestras de la placa fue leída a 450nm en el equipo *Victor Multilabel Plate Reader (PerkinElmer)*.

Cuando el ELISA se realizó de muestras de tumores PDX, de los cuales no era posible obtener un sobrenadante de proteínas secretadas, se pulverizaron los tumores con nitrógeno líquido, utilizando un mortero. A continuación, se realizó la extracción de proteínas añadiendo el tampón RIPA completo y siguiendo el protocolo descrito con anterioridad (apartado 2.3.1). Finalmente se realizaron alícuotas de 100µg de proteína total en 100 µl, que posteriormente se cargarían en la placa de ELISA.

2.4.4.2. ELISA multiplex de citoquinas

Se realizó un ELISA de análisis múltiple de 44 citoquinas para estudiar el secretoma de líneas celulares, comparando los sobrenadantes de líneas celulares con sobre-expresión y con silenciamiento de IL-11.

En cuanto a la obtención de las muestras de sobrenadantes para el ELISA, se sembró 1 millón de células con silenciamiento o sobre-expresión de IL-11 en 8ml de medio al 5% de SFB, además de la línea celular con plásmido vacío. Pasadas 48 horas, se recogió 1ml del sobrenadante del que se usarían 100µl para cada pocillo de la placa de ELISA. Las muestras se cargaron por duplicado. En este caso no fue necesario normalizar con la cantidad de proteína total, sino que se analizó el resultado obtenido entre la línea con plásmido vacío y esa misma línea celular con silenciamiento o sobre-expresión de IL-11, añadiendo el mismo número de células de ambas líneas celulares para que el resultado fuera comparable. Previamente habíamos corroborado que en 48 horas no había diferencias en el crecimiento entre las líneas con silenciamiento o sobre-expresión de IL-11 y la línea celular con el plásmido vacío correspondiente.

En el ensayo se mezclaron bolas magnéticas del kit *ProcartaPlex* (*Thermo Fisher Scientific*) que tenían acoplado un anticuerpo que reconocía la citoquina de interés y un compuesto que daría lugar a una reacción colorimétrica distinta para cada citoquina. Se realizó la mezcla de 5 paneles con anticuerpos para distintas citoquinas (B-G). Dicha mezcla de bolas se añadió a una placa de ELISA y se incubó con las muestras de interés. Tras lavar la placa, conservando las bolas con un imán, se realizó la incubación con un anticuerpo de detección, que llevaba acoplada la enzima responsable de la reacción colorimétrica y se realizó la lectura en el equipo *Luminex 100/200* (*Thermo Fisher Scientific*). Las citoquinas incluidas en el kit fueron:

- MixB: GM-CSF, IFN-γ, IL-1β, IL-12p70, IL-13, IL-18, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α
- MixC: IL-10, IL-17A, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27, IL-9
- MixD: IFN-α, IL-1α, IL-1RA, IL-15, IL-31, IL-7, TNF-β
- MixF: Eotaxina, Gro-α, IL-8, IP-10, MIP-1α, MIP-1β, RANTES, SDF-1α

- MIXG: BDNF, NGF, EGF, FGF-2, HGF, LIF, PDGF-BB, PIGF-1, SCF, VEGF-A, VEGF-D.

Se eliminaron del análisis de datos las citoquinas que no mostraron expresión en las muestras incluidas o que se expresaban tanto que la señal que producían estaba saturada. Para la cuantificación del resultado, se obtuvo el incremento de la secreción de cada citoquina en la línea celular con sobre-expresión o silenciamiento de IL-11 con respecto a su plásmido vacío correspondiente. Este incremento se calculó restando los pg/ml de cada citoquina secretados por las líneas con sobre-expresión o silenciamiento de IL-11 menos los pg/ml secretados por la línea con el plásmido vacío.

2.4.5. Inmunohistoquímica (IHQ)

Las tinciones inmunohistoquímicas de muestras de pacientes fueron llevadas a cabo en el Hospital 12 de Octubre. Las muestras de tumores se encontraban fijadas en formalina al 10% e incluidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 2-3,5 µm en micrótomos de rotación semi-motorizado (*Leica Biosystems*) que se tiñeron con anticuerpos para la detección de IL-11 e IL-11RA (Tabla 1), de manera automática en el equipo BONDIII (*Leica Biosystems*), utilizando los reactivos recomendados por el proveedor. La unión del anticuerpo primario se visualizó mediante *Bond Polymer Refine Detection* (*Leica Biosystems*), que incluía además una contratinción por hematoxilina. Finalmente, se deshidrató completamente la muestra con alcoholes en concentraciones crecientes/ascendentes y xilol, y el montaje se hizo con *Acrytol Mounting Media* (*Leica Biosystems*). Las fotos se tomaron con un microscopio de campo claro (*Leica Biosystems*). La valoración fue realizada por una patóloga clínica, que graduó la intensidad de la tinción en 4 categorías: ausencia de tinción o negativo, tinción débil, tinción moderada y tinción fuerte. La extensión de la tinción se estimó según el porcentaje de células positivas respecto a las células tumorales totales de toda la sección. Debido al número limitado de muestras y a que, en su mayoría, tanto para IL-11 como para IL-11RA, la valoración de las tinciones era débil y moderada, se realizaron 2 grupos para el análisis de los datos: tinción positiva, englobando a las muestras con tinción débil, moderada y fuerte, y tinción negativa. En el caso de las tinciones para IL-11, se consideró tinción positiva tanto la tinción tumoral como la estromal.

Las inmunohistoquímicas de tumores *xenografts* de líneas celulares y de PDX fueron realizadas por la unidad de histopatología del CNIO. Las muestras fueron fijadas en formalina 10%, embebidas en parafina y cortadas a 3 µm. Para las tinciones inmunohistoquímicas, se usó una plataforma automática (*Ventana Discovery XT, Roche*

o *Austistainer Link*, *Dako*), usando los reactivos propios del fabricante. Tras el desparafinado y recuperación antigénica con el tampón de selección, se incubó el anticuerpo primario (Tabla 1) utilizando un sistema basado en un multímero para la detección, *OmniMap-HRP* o *Novolink polymer* frente a conejo, y un puente anti-ratón en el caso de que los anticuerpos primarios fueran obtenidos de ratón. Para el revelado cromogénico se utilizó *ChromoMap DAB*, incluida en el kit para el multímero unido a peroxidasa. Finalmente, se realizó la contratinción con hematoxilina durante 5 minutos y la muestra se deshidrató para su montaje.

Para la hibridación con sonda ALU-II, se utilizó una plataforma automática (*Ventana Discovery XT*, *Roche*), en las condiciones establecidas por el fabricante. Tras el desparafinado y recuperación antigénica con el tampón de selección y un tratamiento enzimático, se incubó con la sonda (marcada con DNP) el tiempo establecido previamente en el protocolo. Tras ello, se realizan lavados de astringencia y la incubación con el anticuerpo secundario, anti-DNP. Se utilizó un sistema basado en un multímero para la detección, *OmniMapHRP*. Para el revelado cromogénico se usó DAB incluida en el kit para el multímero unido a peroxidasa. Finalmente, se realizó una contratinción con hematoxilina durante 5 minutos para el posterior montaje de la muestra.

Para la tinción de hematoxilina&eosina, las muestras incluidas en portas se desparafinaron en xilol y se hidrataron con alcoholes de graduaciones decrecientes hasta llegar a agua. Finalmente se tiñeron, se deshidrataron y se montaron en medio permanente.

2.5. Generación del anticuerpo neutralizante anti-IL-11RA

En colaboración con la unidad de cristalografía e ingeniería de proteínas y la de anticuerpos monoclonales del CNIO hemos generado el anticuerpo neutralizante de IL-11RA. El antígeno necesario para inducir la respuesta inmune en el animal fue el dominio extracelular de la proteína IL-11RA humana unido a un fragmento Fc-HIS. Esta construcción la produjo la unidad de cristalografía ingeniería de proteínas del CNIO, en células de mamífero HEK293 y la purificó mediante cromatografía de afinidad con proteína-A, seguida de filtración en gel. A continuación, se inmunizaron ratas de la cepa *Wistar* con el antígeno producido con 3 inyecciones intraperitoneales de 100µg de proteína. A los 3 días se sacrificó al animal y se extrajo el bazo, donde se encontró una población numerosa de linfocitos B productores de anticuerpos. Los esplenocitos de rata fueron disgregados y fusionados con la línea celular de mieloma de ratón NS-1, mediante el empleo de polietilenglicol, dando lugar a hibridomas, capaces de producir anticuerpos

y de proliferar indefinidamente. A los 10 días las colonias formadas por los hibridomas fueron testadas para confirmar la producción del anticuerpo de interés mediante ELISA e IHQ. Las colonias productoras del anticuerpo de interés fueron clonadas para asegurar que el anticuerpo obtenido se produjo a partir de un único hibridoma, dando lugar a un anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo obtenido se validó para su reconocimiento de IL-11RA mediante placas de ELISA tapizadas con la proteína IL11RA-Fc-HIS, así como con citospines de células HEK293T transfectadas con el plásmido pCMV6-IL11RA (*Origene*) y por WB en células con y sin sobre-expresión de IL-11RA (anticuerpo diluido 1:500).

El sobrenadante obtenido del clon seleccionado fue purificado mediante cromatografía de afinidad, utilizando una columna de proteína G acoplada a un equipo AKTA prime. Las fracciones obtenidas fueron dializadas toda la noche frente a PBS y cuantificadas mediante *NanoDrop™ 2000/2000c* (*Thermo Fisher Scientific*).

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.1. Líneas celulares

En el presente estudio se ha utilizado un panel de 12 líneas celulares de pulmón, compuesto por 10 líneas celulares de adenocarcinoma y 2 líneas celulares no tumorales, inmortalizadas. Dentro de las 10 líneas celulares de adenocarcinoma pulmonar: 3 presentan mutaciones en *KRAS*, 3 en *EGFR*, 2 la translocación EML4-ALK y 2 líneas celulares no presentaban ninguna de las alteraciones anteriores (nombradas como *triples negativas*). A continuación, se describe cada línea celular, con su alteración genómica y el medio de cultivo en el que fueron crecidas (Tabla 8).

Tabla 8. Panel de líneas celulares de pulmón comerciales utilizadas en este estudio

Línea celular	Histología	Alteración de interés	Referencia	Medio de cultivo
A549	Adenocarcinoma	KRAS p.G12S	COSMIC	RPMI 1460
H358	Adenocarcinoma	KRAS p.G12C	COSMIC	RPMI 1460
H23	Adenocarcinoma	KRAS p.G12S	COSMIC	RPMI 1460
HCC827	Adenocarcinoma	EGFR E746-E750 del	COSMIC	RPMI 1460
H1650	Adenocarcinoma	EGFR E746-E750 del	COSMIC	RPMI 1460
H1975	Adenocarcinoma	EGFR L858R/T790M	COSMIC	RPMI 1460
H2228	Adenocarcinoma	Translocación EML4-ALK v3	COSMIC	RPMI 1460
H3122	Adenocarcinoma	Translocación EML4-ALK v1	COSMIC	RPMI 1460
H1437	Adenocarcinoma	Triple negativa	COSMIC	RPMI 1460
Calu-3	Adenocarcinoma	Triple negativa	COSMIC	DMEM
NuLi-1	Epitelio sano	Triple negativa	COSMIC	LHC-9
NL-20	Epitelio sano	Triple negativa	COSMIC	F12 suplementado (Receta en ATCC)

Además de las células comerciales, se utilizaron líneas celulares procedentes de cultivos primarios, cedidas por laboratorios con los que se establecen colaboraciones (Tabla 9).

Tabla 9. Panel de líneas celulares primarias utilizadas en este estudio

Línea celular	Histología	Laboratorio de origen	Medio de cultivo
LC5	Fibroblasto normal pulmonar	Dr. G. Criado (Instituto de Investigación i+12)	RPMI 1460
CAFs	Fibroblasto aislado de tumor (7 líneas celulares provenientes de pacientes con adenocarcinoma de pulmón)	Dr. A. Sweet-Cordero (UCSF)	DMEM

Las líneas celulares comerciales se cultivaron siguiendo las indicaciones de la ATCC, suplementando todos los medios con una solución antibiótica/antimicótica 1X (*Sigma-Aldrich*) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se cultivaron en placas de 10 cm y se subcultivaron 1:4 cada 2-3 días mediante tratamiento con tripsina (*Sigma-Aldrich*). Como excepción, la línea NL-20 se cultiva al 5% de SFB y no requiere tripsina para ser pasada ya que en su lugar se utiliza la solución *Hank's Balanced Salt Solution* (*Sigma-*

Aldrich). Los fibroblastos se crecieron en su medio de cultivo específico con 10% de SFB y la solución de antibiótica/antimicótica 1X.

La manipulación de las líneas celulares se realizó en cabina de flujo laminar de tipo II-Bio-II-A (nivel de bioseguridad 2) (*TelStar*) y su cultivo en incubadores *Aire US Autoflow Walter-Jacketed* (*Thermo Fisher Scientific*), al 95% de humedad relativa y al 5% de CO₂. Para asegurar la ausencia de contaminación por micoplasmas, se pasaron controles regulares internos y de nuestro centro de investigación, mediante el uso del kit *MycoAlert* (*Lonza*).

3.2. Conservación de las líneas celulares

Partiendo de células cultivadas en placa estándar (10 cm), a una confluencia del 70-80%, el cultivo se tripsinizó, se recogió en tubos de 15 ml con 5 ml de medio de cultivo y, tras su centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo, con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (*Sigma-Aldrich*). Cada mililitro de esta suspensión se añadió a un criovial para su congelación gradual en contenedores con isopropanol a -80°C. Posteriormente, las células se conservaron a -80°C a medio plazo y en contenedores con nitrógeno líquido a largo plazo.

Para descongelar una línea celular criopreservada, el criotubo se sumergió en un baño de agua a 37°C hasta su descongelación. Seguidamente, la suspensión celular se añadió a 5 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó y se añadió medio de cultivo fresco para resuspender el *pellet* obtenido y añadirlo a la placa de cultivo de 10 cm, con un volumen final de 10 ml.

3.3. Transfección de células

Para la sobre-expresión de los genes de interés se introdujo en las células el plásmido de sobre-expresión correspondiente (Tabla 1), mediante transfección, utilizando el reactivo *TransIT-X2* (*Mirus Bio*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. La transfección con este reactivo se basa en la utilización de liposomas catiónicos que forman complejo con el ADN y permiten su introducción al núcleo celular. Veinticuatro horas antes de la transfección se sembraron las células en placas de 6 pocillos, buscando aproximadamente un 50% de confluencia en cada pocillo para el día de la transfección. Antes de la transfección, se cambió el medio a las células añadiendo 2,5 ml de medio. A continuación, se añadieron las partículas de transfección (7.5 µl) con el ADN (2.5 µl a 1

µg/µl) y las células se incubaron con éstas durante 48 horas. Tras este tiempo, las células se pasaron a placas de 10 cm y, una vez adheridas (tras unas 24 horas), se añadió medio fresco con el antibiótico de selección a la concentración adecuada: genitocina (G418) 1 mg/ml (*Santa Cruz Biotechnology*), higromicina B, 30 µg/ml (*Thermo Fisher Scientific*) y puromicina, 1 µg/ml (Nucliber-Invitrogen). Como control negativo de la transfección se utilizó siempre la línea celular sin transfectar también expuesta al mismo medio de selección.

Durante el proceso de selección de las células transfectadas (3 ó 4 semanas), el medio de cultivo con antibiótico se renovó 3 veces por semana. Las colonias generadas se levantaron y se resembraron en una nueva placa, estableciendo un *pool* de los diferentes clones transfectados, con el que se constituyó una línea celular transfectada estable. En la línea generada se confirmó la sobre-expresión o silenciamiento realizado (por WB o ELISA, si la proteína sobre-expresada es de secreción) y se congelaron viales suficientes para su mantenimiento.

Una vez establecida la línea, se mantuvo con el antibiótico de selección a la mitad de concentración utilizada previamente para realizar la selección. Siempre que se generaba una línea celular con sobre-expresión de IL-11 o IL-11RA, también se generaba una línea celular transfectada con el mismo plásmido vacío que se usaba como control para los experimentos posteriores. A continuación, mostramos todas las líneas celulares generadas por transfección en esta tesis (Tabla 10).

Tabla 10. Panel de líneas celulares transfectadas utilizadas en este estudio

Línea celular	Plásmido introducido	Medio de cultivo
H358 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
H358 IL-11	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11)	RPMI 1460 + G418
H358 IL-11RA	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11RA)	RPMI 1460 + G418
H3122 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
H3122 IL-11	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11)	RPMI 1460 + G418
H3122 IL-11RA	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11RA)	RPMI 1460 + G418
HCC827 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
HCC827 IL-11RA	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11RA)	RPMI 1460 + G418
H1437 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
H1737 IL-11RA	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11RA)	RPMI 1460 + G418
NL-20 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
NL-20 IL-11RA	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11RA)	RPMI 1460 + G418
LC5 PV	pCMV6 (Plásmido vacío)	RPMI 1460 + G418
LC5 IL-11	pCMV6-IL-11 (sobre-expresión de IL-11)	RPMI 1460 + G418

Se realizaron co-transfecciones también, con el fin de co-sobre-expresar en una misma línea celular IL-11 e IL-11RA. Para ello, se escogieron líneas celulares, que ya tenían introducido un plásmido pCMV6-IL-11RA, para sobre-expresión de IL-11RA, y se les realizó una segunda transfección para introducir un plásmido pCMV3-IL-11, para sobre-expresar IL-11 con un antibiótico de selección distinto (Tabla 11).

Tabla 11. Panel de líneas celulares co-transfectadas utilizadas en este estudio

Línea celular	Plásmido introducido	Medio de cultivo
H358/H3122/NL-20 <i>PV1/ PV2</i>	pCMV6/pCMV3 (Plásmidos vacíos 1 y 2)	RPMI 1460 + G418 + Higromicina B
H358/H3122/NL-20 <i>PV1/ IL-11</i>	pCMV6/pCMV3-IL-11 (Plásmido vacío 1/ Plásmido de sobre-expresión de IL-11)	RPMI 1460 + G418 + Higromicina B
H358/H3122/NL-20 <i>IL-11RA/PV2</i>	pCMV6-IL-11RA/pCMV3 (Plásmido de sobre- expresión de IL-11RA/ Plásmido vacío 2)	RPMI 1460 + G418 + Higromicina B
H358/H3122/NL-20 <i>IL-11RA/IL-11</i>	pCMV6-IL-11RA/pCMV3-IL-11 (Plásmido de sobre-expresión de IL-11RA/Plásmido de sobre-expresión de IL-11)	RPMI 1460 + G418 + Higromicina B

3.4. Infección de células con plásmidos lentivirales

Se utilizaron plásmidos lentivirales para inducir silenciamiento génico por tecnología CRISPR-cas9.

3.4.1. Transfección de células productoras de virus

La línea celular HEK293T fue sembrada en placas de 10 cm, buscando una confluencia en el momento de la transfección del 60%. Tras 24 horas, las células fueron co-transfectadas con los plásmidos lentivirales y con los plásmidos que codifican las proteínas necesarias para producir los virus empaquetadores: psPAX2 y pMD2.G (Tabla 1). En esta ocasión, el reactivo de transfección utilizado fue PEI (polietilenimina) (*Polysciences*) mediante la siguiente mezcla: 1 ml de medio DMEM, 2 µl del plásmido pMD2G (1µg/µl), 8 µl del plásmido psPAX2 (1µg/µl), 10µl del vector pLentiCRISPR v2 (1µg/µl) y 80 µl de PEI (1mg/ml).

Tras mezclar bien por pipeteo, las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se añadieron gota a gota en las placas con HEK293T y 8 ml de medio fresco DMEM. Tras 24 horas, se retiró el medio con la mezcla de transfección y se añadieron 8 ml de medio de cultivo fresco, en el que se acumularían los virus producidos posteriormente.

3.3.1. Infección de células de interés

Los 8 ml de medio de cultivo de las células HEK293T transfectadas, que contenía las partículas virales producidas durante 48 horas, se recogió y se pasó por un filtro de 45 µm de tamaño de poro, tras lo cual se diluyó con 8 ml más del medio fresco en el que crecen las células a infectar. Además, se añadieron 8 µl de polibreno (8 µg/ml) (*Sigma-Aldrich*), que es un polication que reduce la repulsión electrostática entre el virus y la membrana celular, favoreciendo la infección. Posteriormente, se añadieron 8 ml del medio con los virus a una placa de 10 cm, con el cultivo de células a infectar en una confluencia aproximada del 50%. Tras una incubación O/N a 37°C, se retiraron los virus mediante aspiración y lavado con PBS, y se añadió medio completo de crecimiento. Tras 24 horas, se añadió al medio el antibiótico de selección correspondiente.

Como control negativo de la infección se sembraron células infectadas con virus vacíos y seleccionadas con el mismo antibiótico.

3.4.2. Selección de células de interés

Una vez que todas las células del control negativo de infección murieron, se procedió a criopreservar los *pools* de células. En el caso de células infectadas para el silenciamiento de genes con plásmidos CRISPR-cas9, se realizó una selección posterior de los clones con silenciamiento del gen de interés. Para seleccionar los clones, se sembraron 500 células de cada *pool* de células en placas de 10cm, infectadas con plásmidos con tres sgARNs distintos. Por la baja confluencia del cultivo, las células sembradas comenzaron a crecer en colonias que, cuando alcanzaron un tamaño adecuado, fueron transferidas a placas de 24 pocillos. Para ello, se impregnaron en tripsina discos pequeños, estériles, de papel *Whatman*, se colocaron encima de cada clon y, tras unos minutos en contacto, se cogieron y se sumergieron en los pocillos de las placas con 1 ml de medio completo. De cada cultivo celular se seleccionaron de 10 a 20 clones. Tras 24 horas, se retiró el papel *Whatman* de los pocillos y se comprobó que las células estaban pegadas y en crecimiento. En el momento en que los pocillos empezaron a estar confluentes, se pasaron a placas de 6 pocillos y se procedió a comprobar si el silenciamiento había funcionado. En células con silenciamiento de IL-11 se recogió medio de cultivo para analizar la expresión de esta citoquina por ELISA. En el caso de células con silenciamiento de IL-11RA, debido a que el anticuerpo para WB de esta proteína resultaba ligeramente inespecífico y no permitía una correcta validación del silenciamiento, los posibles clones con silenciamiento se pasaron a dos placas de 10 cm, al igual que la línea celular control, sin silenciamiento de IL-11RA, y se estimularon con 50ng/ml de rhIL-11. Por WB se analizó la activación de las proteínas STA3 y STAT1, confirmando que en los clones con silenciamiento de IL-11RA no se activaba esta vía de señalización.

Finalmente, tras comprobar qué clones de cada cultivo celular presentaban silenciamiento del gen de interés, se eligió un clon con el sgARN2, dirigido al gen de IL-11 y del sgARN1 para el gen IL-11RA (Tabla 4), que se amplificó, se criopreservó y se utilizó para hacer los experimentos posteriores. Al igual que se hizo con las líneas celulares con sobre-expresión de IL-11/IL-11RA, también se infectaron células con plásmido vacío, que serviría como condición control. Las líneas celulares silenciadas, generadas por infección, se resumen en la siguiente tabla (Tabla 12).

Tabla 12. Panel de líneas celulares silenciadas utilizadas en este estudio

Línea celular	Plásmido introducido	Medio de cultivo
A549 PV	lentiCRISPR v2	RPMI 1460 + Puromicina
A549 IL-11-KO	lentiCRISPR v2- IL-11 (silenciamiento de IL-11)	RPMI 1460 + Puromicina
A549 IL-11RA-KO	lentiCRISPR v2- IL-11RA (silenciamiento de IL-11RA)	RPMI 1460 + Puromicina
H1975 PV	lentiCRISPR v2	RPMI 1460 + Puromicina
H1975 IL-11-KO	lentiCRISPR v2- IL-11 (silenciamiento de IL-11)	RPMI 1460 + Puromicina
LC5 PV	lentiCRISPR v2	RPMI 1460 + Puromicina
LC5 IL-11KO	lentiCRISPR v2- IL-11 (silenciamiento de IL-11)	RPMI 1460 + Puromicina

3.5. Ensayos celulares funcionales y de señalización

En estos ensayos, cada experimento se repitió un mínimo de tres veces independientes a fin de confirmar los resultados. Además, dentro de cada repetición del experimento, cada condición se sembró por triplicado.

3.5.1. Ensayo de medios condicionados

Se sembró un millón de células tumorales y un millón fibroblastos asociados a tumor (CAFs), cada uno en su correspondiente placa de 10 cm, con 8 ml de medio de cultivo completo. Pasadas 48 horas, el medio de las células tumorales fue filtrado con un filtro de 0,45 μm y diluido con medio fresco 1:2. Dicho medio, filtrado y diluido, se añadió a los CAFs y 48 horas después, se extrajo el ARN y se realizó qRT-PCR (apartado 2.3.3), para poder analizar la expresión de IL-11 por parte de los CAFs influenciada por el secretoma de las células tumorales.

3.5.2. Caracterización de vías de señalización

Se sembraron 2 placas de las células de interés y, una vez alcanzado un 60-70% de confluencia, se incubaron durante 5 horas con medio sin SFB, para conseguir un estado basal de fosforilación de las proteínas de interés. Entonces, por un lado, se obtuvieron extractos proteicos correspondientes al estado basal, y por otro lado se procedió a la estimulación con 50 ng/ml de rhIL-11 (*Immunostep*) en medio al 0% de SFB, durante 15 minutos. Finalmente, se realizó la extracción proteica (apartado 2.4.1), para el posterior análisis de la activación vías de señalización por WB.

Estos ensayos fueron realizados en primer lugar con las células comerciales para determinar en cuáles se producía activación de STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT, y posteriormente se confirmó el resultado utilizando líneas celulares con sobre-expresión de IL-11RA y comparándolas con la misma línea transfectada con su PV correspondiente.

3.5.3. Determinación de la duración de la activación de cascadas de señalización

Para la determinación del nivel de activación de las rutas de interés en las líneas celulares fue necesario realizar WB a distintos tiempos, después de incubar las células O/N sin SFB para sincronizar el cultivo celular. Posteriormente, se añadió medio al 5% de SFB con o sin rhIL-11, dependiendo del experimento, y se realizó la extracción de proteínas a los 15 min, 30 min, 1h y 8h, en caso de líneas con sobre-expresión de IL-11RA, estimuladas con rhIL-11, y a 8h y 24h en el resto de líneas celulares con sobre-expresión y silenciamiento de IL-11. Por WB se comprobó la activación de vías de señalización en el tiempo, como se indica en el apartado anterior.

3.5.4. Ensayos subrogados de diferentes propiedades tumorigénicas

3.5.4.1. Ensayo de proliferación (Curvas de crecimiento a 5% SFB)

Se sembraron entre 15.000-25.000 células por pocillo, en 7 placas de 12 pocillos o 30.000-50.000 células por pocillo en 7 placas de 6 pocillos, dependiendo de la línea celular y del ensayo. A las 24 horas (día 0) se fijaron las células del primer punto de la curva (primera placa) con una solución de PBS al 0.5% de glutaraldehído (*Sigma-Aldrich*), durante 20 minutos. Cada 48 horas se fijó un nuevo punto de la curva y se cambió el medio al resto. Las placas fijadas se conservaron en PBS a 4°C hasta que todos los puntos de la curva estuvieron fijados (pasadas 2 semanas aproximadamente). Entonces, se tiñeron las placas con cristal violeta al 1% (*Sigma-Aldrich*), se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Una vez secas, se añadió un volumen fijo por pocillo de ácido acético al 20% (1ml en placas de 12 pocillos y 2 ml en placas de 6 pocillos), para diluir el cristal violeta, y se midió la absorbancia a 595nm en placa de 96 pocillos con 200 µl de volumen en el *Victor Multilabel Plate Reader* (*PerkinElmer*). Todas las absorbancias se normalizaron con respecto a la absorbancia del día 0 de cada condición experimental. Por último, se representó este valor normalizado (crecimiento relativo al día 0) con respecto al tiempo.

3.5.4.2. *Ensayo de crecimiento en ausencia de suero (Curvas de crecimiento al 0% SFB)*

Para la realización de este ensayo, se sembraron 30.000-50.000 células por pocillo, en 7 placas de 12 pocillos o 60.000-100.000 células en placas de 6 pocillos, en medio de cultivo completo. Al día siguiente, se realizan dos lavados de las placas con PBS y se añadió medio de cultivo sin suero. El resto del experimento se llevó a cabo de la misma forma que el ensayo de proliferación descrito en el apartado anterior, pero utilizando medio sin suero.

3.5.4.3. *Ensayo de clonabilidad*

Se sembraron 100-500 células en 3 placas de 10 cm, o 100-200 células por triplicado en placas de 6 pocillos, dependiendo del ensayo y de la línea celular. El medio, al 5% de SFB, se renovó una vez a la semana durante 2 semanas y las células se fijaron con una solución de glutaraldehído en PBS al 0.5% durante 20 minutos. Posteriormente se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% en agua. Tras lavar y secar las placas, se cuantificó y representó el número de colonias. También se diluyó el cristal violeta con una solución de ácido acético, tal y como se ha explicado en los ensayos anteriores, y se midió la absorbancia en el *Victor Multilabel Plate Reader (PerkinElmer)* para cuantificar el número de células de los clones, añadiendo 200 µl de volumen a una placa de 96 pocillos.

3.5.4.4. *Crecimiento libre de anclaje (ensayo en agar blando)*

Se resuspendieron 100.000 células/pocillo en medio con agarosa (*Invitrogen*) al 0.35%, que se sembraron sobre una base de medio con agarosa al 0.7% previamente solidificado, en placas de 6 pocillos. A las 24 horas de la siembra, se añadieron 3 ml de medio completo a cada pocillo, que se renovó dos veces por semana. Tras uno o dos meses, dependiendo de la línea en ensayo, las colonias que crecieron se tiñeron con cristal violeta al 1% y, tras lavar las placas, se tomaron un mínimo de 5 fotos por pocillo de las colonias por medio del microscopio *Olympus X2-SLP*, con cámara integrada (*Olympus*). En estas fotos se cuantificó el número de colonias de cada línea celular, que posteriormente fue representado.

3.5.4.5. *Ensayo de migración*

Para determinar la capacidad migratoria de las células se realizó la siembra de diferentes líneas celulares en insertos de tamaño de poro de 8 µm (*Costar-Cultek*) en placas de seis pocillos. Para ello, se añadió medio al 5% de SFB en el compartimento inferior que se creaba tras colocar el inserto y en el compartimento superior se añadieron 10.000 células en medio al 1% de SFB. Las células con mayor capacidad de migrar

atravesaron el poro del inserto y se pegaron a la placa de seis pocillos atraídas por la mayor concentración de SFB. Tras 48 horas de la siembra, se fijaron las células con la solución de fijado al 0.5% de glutaraldehído y se tiñeron con cristal violeta al 1%. Tras el lavado y posterior secado de las placas, el cristal violeta se resuspendió en ácido acético al 20% y se midió su absorbancia a 595 nm en un equipo de lectura óptica *Victor Multilabel Plate Reader* (PerkinElmer). El resultado de la lectura fue posteriormente representado de forma que, a mayor absorbancia obtenida, mayor capacidad de migrar mostraron las células.

3.5.4.6. Ensayos funcionales en co-cultivos indirectos de diferentes células tumorales

Se realizaron curvas de crecimiento al 5% y al 0% de SFB, además de ensayos de clonabilidad, en co-cultivos de células con sobre-expresión de IL-11RA. Para ello, se sembraron células con sobre-expresión de IL-11RA en placas de 6 pocillos por triplicado (50.000 células por pocillo, por triplicado, para curvas de crecimiento al 5% de SFB, 100.000 células para curvas de crecimiento al 0% de SFB y 50 células en ensayos de clonabilidad). A continuación, pasadas 24 horas, se sembraron 30.000 células con plásmido vacío o sobre-expresión de IL-11 en insertos o *transwells* de 0.4 μm , evitando que las células se mezclaran, pero permitiendo que los medios de ambas células entraran en contacto. Así, las células pegadas a la placa de 6 pocillos, con sobre-expresión de IL-11RA, recibirían la IL-11 producida por las células sembradas en los *transwells* (Figura 7).

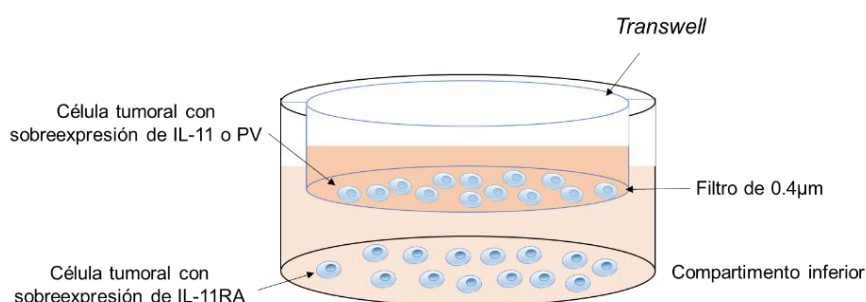


Figura 7. Esquema de siembra de células en co-cultivo con transwells. En placas de 6 pocillos se sembraron células con sobre-expresión de IL-11RA y al día siguiente, se colocó un *transwell* con 30.000 células de la misma línea celular con sobre-expresión de IL-11 o su plásmido vacío.

En el caso de las curvas de crecimiento, se sembraron 7 placas que se fijaron cada 48 horas, cambiando el medio de cultivo 2 veces por semana, para obtener los distintos puntos de la curva. En el caso del ensayo de clonabilidad, se sembró una placa que se mantuvo a 37°C durante 2 semanas, cambiando el medio de cultivo 1 vez a la semana. Pasada una semana desde la siembra de los *transwells*, debido al exceso de células,

éstos fueron retirados y reemplazados por otros con nuevas células sembradas hasta finalizar el ensayo.

Finalmente, cuando todos los puntos de las curvas y la placa de la clonabilidad estaban fijados, se tiñeron con cristal violeta y se diluyeron con una solución de ácido acético, tal y como se ha explicado en los apartados anteriores.

Para caracterizar la activación de vías de señalización se sembraron 50.000 células en el *transwell* y 100.000 células en el compartimento inferior, para retirar 1ml de medio del compartimento inferior 24 horas después y realizar extracción proteica de las células sembradas en el pocillo. Para comprobar la cantidad de IL-11 que llegaba al compartimento inferior se realizó ELISA del sobrenadante recogido y para determinar la activación de vías se realizó WB con las proteínas extraídas.

3.6. Generación de organoides de modelos PDX (Cultivos celulares 3D)

Para generar organoides derivados de tumores PDX (*Patient Derived Xenograft*), primero se extrajo el tumor del ratón y se troceó en fragmentos de 1-2 mm³, que fueron transferidos a un tubo con 5 ml de solución de digestión compuesta por 1,5 mg/ml de colagenasa IA (*Sigma-Aldrich*) en medio de cultivo DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*), suplementado HEPES 1Mm (*Gibco*), *GlutaMax* 1X (*Sigma-Aldrich*) y primocin al 0.25% (*Invivogen*). La muestra se incubó durante 1 hora a 37°C y se pasó por un filtro de 70 µm. Las células sanguíneas fueron lisadas por un tampón de lisis *EasySep* (*Stemcell technologies*). El *pellet* de células fue resuspendido en matrigel (BD), conteniendo 120.000 células en 300 µl de matrigel, y transferido en forma de gotas a placas de 6 pocillos atemperadas a 37°C. Cuando el matrigel solidificó, se añadió medio DMEM/F12, suplementado con HEPES 1 mM, *GlutaMax* 1X, SFB al 2%, primocin al 0.25%, 5 µg/ml de insulina (*Sigma-Aldrich*), 3 ng/ml de EGF (*Life Technologies*), 1 µg/ml de hidrocortisona (*Sigma-Aldrich*), B27 1X (*Life Technologies*) e inhibidor de la quinasa Rho 10.5 µM (*Life Technologies*). Los organoides se incubaron a 37°C, realizando cambios de medio cada 4 días.

3.7. Comprobación de la acción neutralizante del anticuerpo anti-IL-11RA *in vitro*

Para comprobar la acción neutralizante de este anticuerpo *in vitro* se sembraron 250.000 células de la línea celular A549 en 5 pocillos de placas de 6 pocillos y, tras 24 horas, se mantuvieron 5 horas sin SFB. Tras ese periodo, 3 de los pocillos fueron

incubados durante 24 horas a 37°C con concentraciones crecientes de anticuerpo neutralizante (250, 500 y 1000 µg/ml). Al día siguiente, se añadieron 50 ng/ml de IL-11 en 4 pocillos, los 3 con anticuerpo y otro más como control de estimulación. El quinto pocillo, sin anticuerpo y sin rhIL-11 fue el control no tratado (Figura 8). 15 minutos después de la estimulación con rhIL-11 se realizaron extractos proteicos para posteriormente comprobar por WB el nivel de activación de STAT1 y STAT3. Para considerar que el anticuerpo era válido como neutralizante se debía producir una disminución de la fosforilación de las proteínas STAT al estimular con rhIL-11 células incubadas con el anticuerpo. Se seleccionó la concentración de 1000 µg/ml para tratar organoides de PDX (apartado 3.6), de la forma anteriormente descrita, y así comprobar el efecto neutralizante del anticuerpo en modelos *in vitro* 3D.

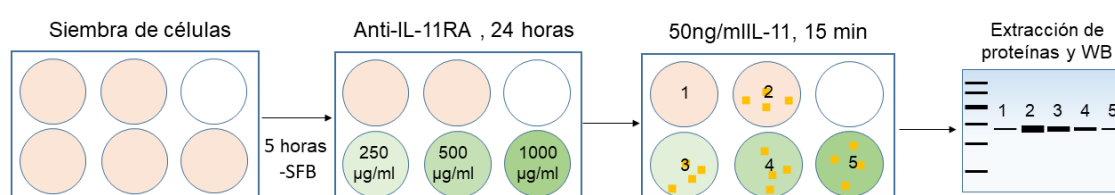


Figura 8. Ensayo de validación del efecto neutralizante del anticuerpo anti-IL-11RA. Las células se sembraron en 5 pocillos, en placas de 6 pocillos y, tras mantenerlas 5 horas sin suero, fueron incubadas con concentraciones crecientes de anti-IL-11RA durante 24 horas. A continuación, a cuatro de los pocillos se añadió rhIL-11, tres pocillos con anticuerpo y uno sin anticuerpo, como control de la estimulación. Tras 15 minutos de la estimulación se realizaron extractos proteicos para comprobar por WB el estado de activación de las proteínas STAT1 y STAT3.

4. TÉCNICAS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Todos los procedimientos realizados con animales fueron realizados en el animalario del CNIO y fueron aprobados por el Comité de Protección Animal de la Comunidad Autónoma de Madrid (PROEX 084/15 y PROEX069/19).

4.1. Xenografts de líneas celulares

Para la generación de dichos modelos animales se utilizaron ratones desnudos, inmunodeprimidos *Hsd:Athymic Nude-Foxn1<nu>* (Charles River Laboratories).

4.1.1. Inyección subcutánea de las líneas celulares

Se contó cada una de las líneas celulares a xenoinjertar y se prepararon alícuotas de 1 millón de células en 50 µl de PBS, 2 por cada ratón a inyectar (N=5). A continuación, se añadió solución de matrigel (BD) a la suspensión celular a razón 1:1 y se inyectó la mezcla

(100 µl) subcutáneamente, en ambos flancos de ratones inmunodeprimidos de 5-8 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isoflurano.

Se realizaron dos tipos de experimentos de *xenografts* diferentes, uno en el que se inyectaron líneas celulares con sobre-expresión de IL-11 y/o IL-11RA, y otro en el que se inyectaron líneas celulares con silenciamiento de IL-11 o IL-11RA. Para cada tipo de ensayo, el diseño de los grupos fue el siguiente:

- Experimentos de sobre-expresión: Utilizando siempre la misma línea celular con sobre-expresión de IL-11RA, IL-11 o su plásmido vacío se establecieron los siguientes grupos:
 - Grupo PV: 1 millón de células transfectadas con el plásmido vacío.
 - Grupo PV/IL-11: 500.000 células con el PV y 500.000 con sobre-expresión de IL-11.
 - Grupo PV/IL-11RA: 500 células con el PV y 500.000 con sobre-expresión de IL-11RA
 - Grupo IL-11/IL-11RA: 500.000 células con sobre-expresión de IL-11 y 500.000 con sobre-expresión de IL-11RA.
- Experimentos de silenciamiento: Utilizando la misma línea celular con silenciamiento de IL-11 o de IL-11RA se establecieron dos grupos:
 - Grupo PV: 1 millón de células con el plásmido vacío.
 - Grupo KO: 1 millón con silenciamiento de IL-11 (IL-11-KO) o IL-11RA (IL-11RA-KO).

4.1.2. Seguimiento de los tumores y determinación del crecimiento tumoral

El tamaño de los tumores generados por los xenoinjertos se midió semanalmente, con un calibre digital. Se tomó medida de la longitud más corta y de la más larga de cada tumor y el volumen tumoral se calculó con la fórmula:

$$0,5 \times (\text{dimensión más larga}) \times (\text{dimensión más corta})^2$$

Se representó la media de los volúmenes tumorales normalizados con respecto al tiempo. Ésta se calculó normalizando el volumen tumoral de cada medida a la primera realizada (15 días tras la implantación). El error medio se calculó con la fórmula *desviación estándar*/ \sqrt{n} , donde n es el número de tumores en cada grupo.

Una vez que los tumores alcanzaron los 1.000 mm³ de volumen (3-5 semanas después del comienzo del experimento), los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y los tumores extraídos. Se realizó la necropsia completa de estos ratones en busca de tejidos que pudieran estar alterados, y se recogió una muestra de éstos en caso de

estarlo, que fue fijada en formalina y conservada en parafina para su posterior análisis. Las muestras tumorales fueron troceadas y un fragmento fue fijado en formalina e incluido en parafina para su conservación y posterior análisis por IHQ. El resto de la muestra tumoral se trocó y se crioperservó a -80°C para su posterior extracción de ADN, ARN o proteína, y análisis.

4.2. Xenoinjertos de tumores derivados de pacientes (PDXs)

Para la obtención de modelos PDX (*Patient Derived Xenograft*), también se utilizaron ratones desnudos, inmunodeprimidos o atímicos *Hsd:Athymic Nude-Foxn1<nu>* (*Charles River Laboratories*).

4.2.1. Establecimiento de colección de modelos PDX

En el actual proyecto de tesis se ha utilizado una colección de 13 modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón generada previamente por nuestro grupo. Para generarla, se utilizaron tumores de pacientes operados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, que se implantaron en ratones inmunodeprimidos en el animalario del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS) (CEI: 2013 PI1277; SSA/SI IMDIpdm). Posteriormente, esta colección se trasladó al CNIO, donde actualmente se mantiene y se utiliza para diferentes proyectos (CEI 16/355; PROEX 084/15).

Para establecer los PDXs, se utilizaron pequeños fragmentos frescos de estos tumores, que fueron embebidos en matrigel (BD) e implantados en el flanco de ratones inmunodeprimidos de 5-8 semanas de edad, bajo anestesia por inhalación de isoflurano y bajo analgesia con buprenorfina. Para realizar el implante, se realizó un pequeño corte en los flancos del ratón y se introdujo un fragmento tumoral de unos 50-100 mm³ de volumen. El seguimiento del tamaño de los tumores se realizó de forma semanal, con calibre digital. Una vez los tumores alcanzaron un volumen de 1.000 mm³ se sacrificó al animal y se extrajeron los tumores, que se trocearon en diferentes fragmentos para implantar en más ratones y expandir el modelo, y para criopreservar e implantar después y así poder realizar distintos tratamientos. Además, algunos fragmentos fueron fijados con formalina y embebidos en parafina (bloques realizados por la unidad de histopatología del IBIS y CNIO), o congelados para su posterior extracción de ADN, ARN y proteína.

Los modelos PDXs fueron caracterizados para la expresión de ARNm (por RT-qPCR) y para la expresión de las proteínas de interés en este proyecto (por WB y ELISA). Esta

caracterización permitió la selección de los modelos más apropiados para la realización de los distintos estudios *in vivo* de esta tesis.

4.2.2. Estimulación de modelos PDX con rhIL-11

Se realizaron estimulaciones con rhIL-11 para comprobar su efecto en el crecimiento de los tumores. Para esto, se implantaron fragmentos de cada modelo de interés en 6 ratones por grupo y se midió el crecimiento de los tumores. Al alcanzar éstos un volumen de entre 150 y 200 mm³, los ratones se distribuyeron en dos grupos, con 5 ratones por grupo, con una media y desviación estándar similar de tamaño tumoral. En uno de los grupos se administró solo el vehículo (suero fisiológico), y otro que se estimuló con rhIL-11 (generada por la unidad de cristalografía e ingeniería de proteínas), administrándola intraperitonealmente, a una concentración de 500 µg/kg, 3 veces por semana, durante 3 semanas consecutivas. Al final del procedimiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores procesados y almacenados de la manera indicada anteriormente (apartado 4.2.1) para su posterior análisis.

El crecimiento de los tumores se midió cada 5 días y se representó el crecimiento a lo largo del tiempo relativizando cada medida del volumen tumoral a la inicial (en el primer día de tratamiento) y se representó la media del crecimiento de los tumores de los 5 animales de cada grupo y su error medio.

4.2.3. Tratamiento de modelos PDX con el anticuerpo neutralizante de IL-11RA

Tras validar la actividad neutralizante del anticuerpo anti-IL-11RA *in vitro*, éste se utilizó para estudiar su efecto en modelos PDX. Se implantó el modelo seleccionado en 18 ratones, que posteriormente fueron distribuidos en 3 grupos de 5 ratones: un grupo control, que fue tratado con vehículo (suero fisiológico), un grupo tratado con anti-IL-11RA (300 µg/ratón) y un grupo tratado con el anticuerpo control anti-GST (glutación-S-transferasa) (300 µg/ratón). Se realizaron inyecciones intraperitoneales 3 veces a la semana, durante 3 semanas consecutivas. Al final del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y los tumores procesados y almacenados como ha sido indicado anteriormente (apartado 4.2.1) para su posterior análisis.

Se representaron gráficas del crecimiento relativo de los tumores a lo largo del tratamiento, relativizando el crecimiento de los mismos con el que tenían el primer día de tratamiento.

4.3. Modelos animales genéticamente modificados (GEMMs)

Se utilizaron los animales GEMMs (*Genetically Engineered Mice Models*) $KRAS^{LSLG12Vgeo}:P53^{loxP}$, cedidos el Dr. Mariano Barbacid (CNIO). Dicho modelo fue obtenido previamente por cruces de los modelos animales $KRAS^{LSLG12Vgeo}$ (Guerra *et al*, *Cancer Cell*, 2007) y $P53^{LoxP}$ (*The Jackson Laboratory*). El genotipo utilizado para nuestros ensayos fue el $KRAS^{+/Kl}:P53^{lox/lox}$.

Este modelo animal desarrolla tumores de adenocarcinoma tras la administración intranasal de partículas adenovirales que expresan la cre-recombinasa. El enzima inoculado en el pulmón realiza cortes en los fragmentos loxP que flanquean, por un lado, un codón STOP situado antes de la mutación G12V de *KRAS* y, por otro lado, el gen *TP53*. Tras el corte, se expresará *KRAS G12V* y se silenciará el gen *TP53*, siendo ambos sucesos los responsables del desarrollo de los tumores con posterioridad (Figura 9).

4.3.1. Inducción de tumores

Se utilizaron 15 ratones de 8 a 9 semanas de vida, que se inoculaban intranasalmente con 1×10^6 partículas de adenocore (ad5CMVcre, Universidad de Iowa) por ratón, diluidas en 60 μ l de suero fisiológico. Los animales fueron previamente anestesiados con una solución 1:1 de ketamina y xilacina.

A los 6 meses desde la inyección se realizó una prueba de imagen por micro-CT (microtomografía computerizada) para confirmar la existencia de tumores. Con las medidas obtenidas a través del software del micro-CT y mediante la fórmula descrita en el apartado 4.1.2, se determinó el tamaño de todos los tumores. Estas mediciones se realizaron de forma periódica, una vez al mes, a partir de los 6 meses, para monitorizar el crecimiento de los tumores y la aparición de tumores nuevos (Figura 9), y así definir el inicio de los tratamientos, los cuales empezaron cuando los ratones presentaban tumores de un volumen de 3-5 mm³.

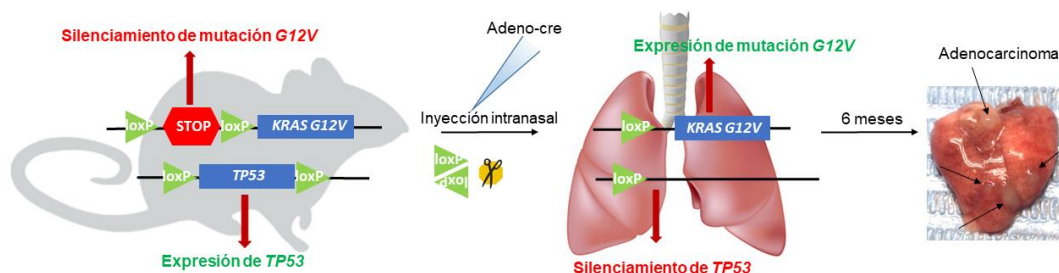


Figura 9. Generación de tumores en el modelo animal $KRAS^{LSLG12Vgeo}:P53^{loxP}$. Tras la administración intranasal de las partículas virales adenocore, se expresó la mutación en *KRAS* G12V y se silenció el gen *TP53*. Tras 6 meses, comenzaron a desarrollarse adenocarcinomas pulmonares en los animales tratados, que se monitorizaron por micro-CT.

4.3.2. Estimulación con rhIL-11 en modelos animales con adenocarcinoma pulmonar producidos por *KRAS/P53*

Cuando los ratones presentaban tumores con un volumen de 3-5mm³ se comenzaba el tratamiento y se realizaba un micro-CT en el primer día de tratamiento, que se establecería como medida cero. Posteriormente, y de la forma descrita anteriormente (apartado 4.1.2), los animales con tumores de pulmón fueron divididos en 2 grupos, de 5 animales por grupo: un grupo control, tratado con vehículo (suero fisiológico) y un grupo tratado con rhIL-11 intraperitonealmente, a una concentración de 500 µg/kg, 3 veces a la semana, durante 4 semanas.

El mismo día que finalizaba el tratamiento, se hizo un micro-CT (para obtener el volumen final de los tumores), antes de sacrificar a los animales. En la necropsia, se recogieron las siguientes muestras: plasma, lavado broncoalveolar, muestras de diferentes tejidos, que fueron fijados en formalina e incluidos en bloques de parafina, y muestras de los tumores de pulmón. Cuando el tumor tenía un tamaño que lo permitía, se troceaba para su conservación a -80°C y, además, para su inclusión en parafina. También se criopreservó muestra de una porción de pulmón sin tumor visible. El resto del pulmón, que contenía tumores de menor tamaño, fue fijado en formalina e incluido en parafina para análisis posteriores.

La extracción del lavado broncoalveolar se realizaba justo después del sacrificio del animal mediante inhalación de CO₂. El lavado se obtuvo insertando un catéter en la tráquea de los ratones, a través del cual se instiló 1 ml de suero fisiológico con una jeringa en los pulmones, que posteriormente se recogió retrayendo la jeringa. El volumen recogido se conservó a -80°C.

Las muestras obtenidas fueron analizadas para estudiar la expresión proteica mediante WB, IHQ y ELISA. Por otra parte, el tamaño de los tumores se representó relativizando cada medida del volumen tumoral final con respecto a la inicial, y se representó la media y el error medio para cada grupo de animales. También se calculó el incremento en el número de tumores en los diferentes ratones y se representó el número inicial frente al número final.

5. COHORTES CLÍNICAS

Para la determinación del papel pronóstico de IL-11 e IL-11RA, se utilizó una cohorte de pacientes resecaados, diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón en estadio temprano, entre los años 2001 y 2012 en el Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). El proyecto de investigación fue aprobado por el comité ético del hospital (CEI 17/454). Los pacientes firmaron el preceptivo consentimiento informado del biobanco del hospital. Dicha cohorte contaba con muestras de tejido incluido en parafina (Tabla 13), con las que se realizaron tinciones inmunohistoquímicas, y muestras congeladas de algunos de estos pacientes, de las que se extrajo ARN (apartado 2.3.1) y se realizó qRT-PCR (apartado 2.3.4) para estudiar la expresión de IL-11 e IL-11RA (Tabla 14).

Las características clínico-patológicas fueron obtenidas de la historia del paciente y registradas, por un oncólogo clínico, en una base de datos que incluyó los siguientes parámetros: edad, sexo, estado general, estadio TNM, tratamiento recibido, hábito tabáquico, padecimiento de EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), supervivencia global y supervivencia libre de progresión. Los pacientes de los que no se contó con algún dato clínico de relevancia para el análisis tuvo que ser excluido de ese análisis concreto.

Tabla 13. Características de la cohorte del Hospital 12 de Octubre con muestras parafinadas

Cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre (Muestras parafinadas)	
Histología	Adenocarcinoma
Número de pacientes	119
Sexo	Masculino: 90 (75.6%) Femenino: 29 (24.4%)
Mediana de edad (años)	65 [58-73]
Hábito tabáquico	Fumador: 44 (37%) Exfumador: 42 (35.3%) No fumador: 24 (20.1%) Desconocido: 9 (7.6%)
Estadio	I: 71 (59.6%) II: 31 (26.1%) III: 17 (14.3%) IV: 0

Tabla 14. Características de la cohorte del Hospital 12 de Octubre con muestras congeladas

Cohorte del Hospital Universitario 12 de Octubre (Muestras congeladas)	
Histología	Adenocarcinoma
Número de pacientes	67
Sexo	Masculino: 55 (82.1) Femenino: 12 (17.9%)
Mediana de edad (años)	65 [62-72]
Hábito tabáquico	Fumador: 23 (34.3%) Exfumador: 31 (46.3%) No fumador: 9 (13.4%) Desconocido: 4 (6%)
Estadio	I: 38 (56.7%) II: 19 (28.4%) III: 10 (14.9%) IV: 0

Además de la cohorte anterior, se utilizó la información clínica y de expresión de ARNm (ARNseq) de una cohorte de 522 pacientes con adenocarcinoma, disponible públicamente (Tabla 15), procedente del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, <http://cancergenome.nih.gov/>).

Tabla 15. Características de la cohorte clínica pública (TCGA)

Cohorte pública TCGA	
Histología	Adenocarcinoma
Número de pacientes	522
Sexo	Masculino: 219 (37.9%) Femenino: 253 (43.8%) Desconocido: 106 (18.3%)
Mediana de edad (años)	66.9 [59.6-73.4]
Hábito tabáquico	Fumador: 111 (19.2%) Exfumador: 276 (47.8%) No fumador: 71 (12.3%) Desconocido: 120 (20.7%)
Estadio	I: 252 (43.6%) II: 115 (24.2%) III: 79 (13.7%) IV: 25 (4.3%) Desconocido: 107 (18.5%)

En las 3 tablas anteriores, las variables categóricas se representaron como número de pacientes (porcentaje del total) y las cuantitativas como mediana [rango intercuartílico].

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los paquetes de software estadístico SPSS (IBM) o GraphPad Prism, usando los test estadísticos que se detallan a continuación para obtener los p-valores. Se consideraron estadísticamente significativos aquéllos por debajo de 0.05 (* ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$)).

6.1. Análisis de los experimentos *in vitro* e *in vivo*

Para analizar si las diferencias encontradas entre las diferentes condiciones testadas en los experimentos *in vitro* eran estadísticamente significativas, se realizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis (dependiendo del número de condiciones a comparar) en los valores correspondientes a las réplicas biológicas independientes de los experimentos. Para analizar si las diferencias de crecimiento de los tumores de las diferentes condiciones experimentales en los ensayos *in vivo* alcanzaban la significancia estadística, se realizaron los mismos tests en los valores correspondientes a las normalizaciones de los tamaños tumorales.

6.2. Análisis de las cohortes clínicas

Respecto a los datos clínicos, se usó el método de Kaplan-Meier para el análisis de la supervivencia, usando el modelo de Log-Rank para obtener el p-valor y el modelo de Cox de riesgos proporcionales para ajustar a las variables. La supervivencia global se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico y la última revisión clínica o fallecimiento. La supervivencia libre de progresión se definió como el periodo de tiempo entre el diagnóstico inicial y el diagnóstico de recidiva o muerte.

RESULTADOS

1. PAPEL DE IL-11 EN EL ADENOCARCINOMA DE PULMÓN

1.1. Papel de IL-11 en la célula tumoral *in vitro* en *in vivo*

1.1.1. Caracterización de la señalización de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón

Para estudiar el efecto de IL-11 en adenocarcinoma de pulmón se utilizó un panel de 12 líneas celulares compuesto por 10 líneas celulares de adenocarcinoma y 2 líneas celulares de epitelio pulmonar inmortalizadas, no tumorales. Entre las 10 tumorales, se eligieron líneas celulares representativas de las 3 alteraciones moleculares de mayor relevancia en el adenocarcinoma de pulmón: 3 líneas tenían mutación en *KRAS*, 3 mutación en *EGFR*, 2 translocación *EML4-ALK* y 2 no mostraban ninguna de las alteraciones citadas (a las que se denominó *triples negativas*).

Se determinó en el panel de líneas seleccionadas la expresión de IL-11 tanto a nivel de ARNm, por RT-qPCR (Figura 10A), como de proteína secretada, por ELISA (Figura 10B). También se determinó la expresión de las dos subunidades que conforman el receptor de IL-11 (GP130 e IL-11RA) a nivel de ARN (Figura 10C-D) y de proteína por WB (Figura 10E).

A549 fue la línea que más IL-11 expresaba a nivel ARNm (Figura 10A) y que más secretaba (Figura 10B). La línea H1975 también mostró niveles elevados de secreción de IL-11, y H358 y NuLi-1 mostraban niveles intermedios (Figura 10B). En resto de líneas celulares la expresión de IL-11 fue mínima o inexistente. Respecto a los niveles de expresión de IL-11RA, a pesar de la inespecificidad del anticuerpo utilizado, se observó que eran similares en todas las líneas celulares, mientras que los de GP130 sí variaron entre las distintas líneas, siendo A549, H23, HCC827, Calu-3 y NL-20 las que más proteína expresaron (Figura 10E). No se encontró ninguna asociación significativa entre la expresión de IL-11 o sus subunidades receptoras y la aberración genómica subyacente a las líneas del panel.

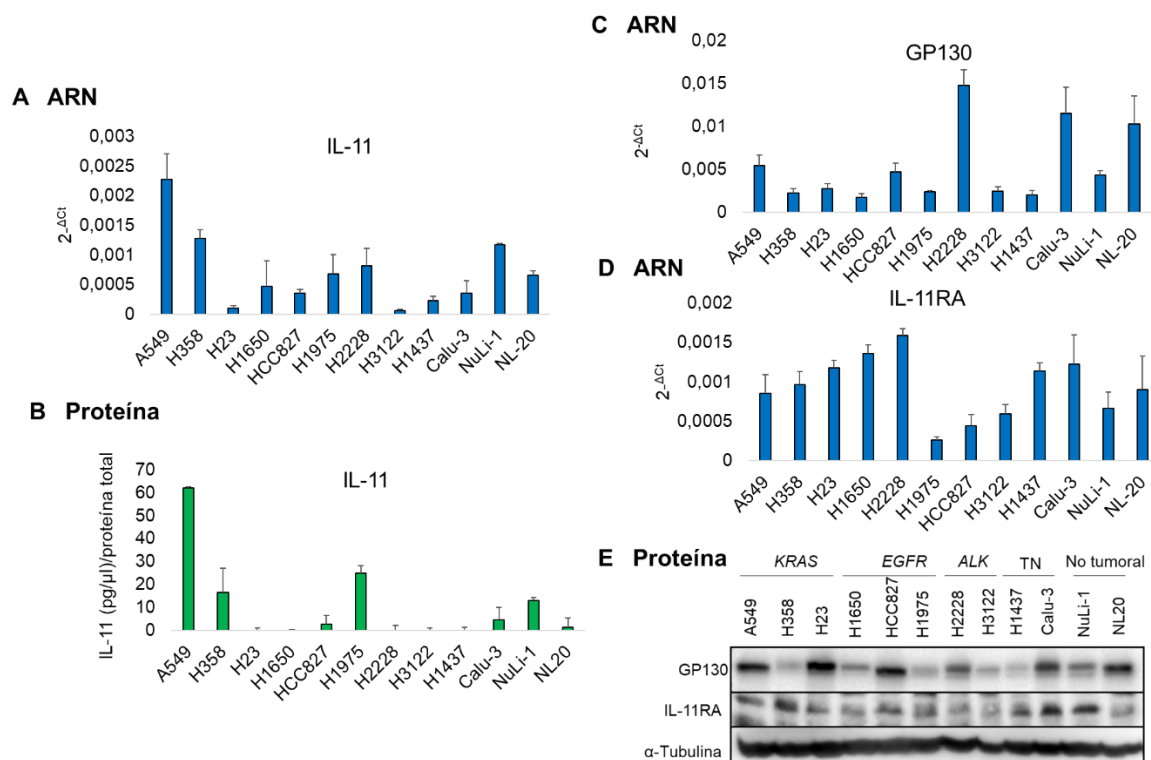


Figura 10. Caracterización de un panel de líneas celulares de pulmón para la expresión de IL-11, GP130 e IL-11RA. Para cuantificar la expresión de ARNm de IL-11, GP130 e IL-11RA se llevaron a cabo RT-qPCRs (A, C, D). La secreción de IL-11 se realizó por ELISA (B) y la expresión de las proteínas IL-11RA y GP130 se determinaron por WB (E). Cada experimento se realizó por triplicado. Se muestran la media y la desviación típica de las tres réplicas en las RT-qPCR y el ELISA. Los WB mostrados son representativos de las réplicas. *KRAS*=*KRAS* mutada, *EGFR*=*EGFR* mutada, *ALK*=portadora de translocación *ALK-EML4*, *TN*=triple negativa.

A continuación, se analizaron las rutas de señalización activadas por IL-11 en 10 de las 12 líneas celulares del panel. Se estimularon las líneas con la proteína recombinante humana IL-11 (rhIL-11), durante 15 minutos y se obtuvieron extractos proteicos para analizar por WB, la activación de las rutas JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT (Figura 11A).

La cuantificación mostró un patrón heterogéneo en la activación de las diferentes vías de señalización analizadas (Figura 11B). IL-11 aumentó significativamente la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT3 en las líneas celulares A549 y NL-20. También aumentó la fosforilación de estas dos proteínas en las líneas H3122, H1437, H1650 y H358. Con respecto a ERK1/2, IL-11 aumentó su fosforilación solo en las líneas *KRAS* mutadas A549 y H358, y respecto a AKT, IL-11 solo activó significativamente esta vía en la línea *KRAS* mutada A549.

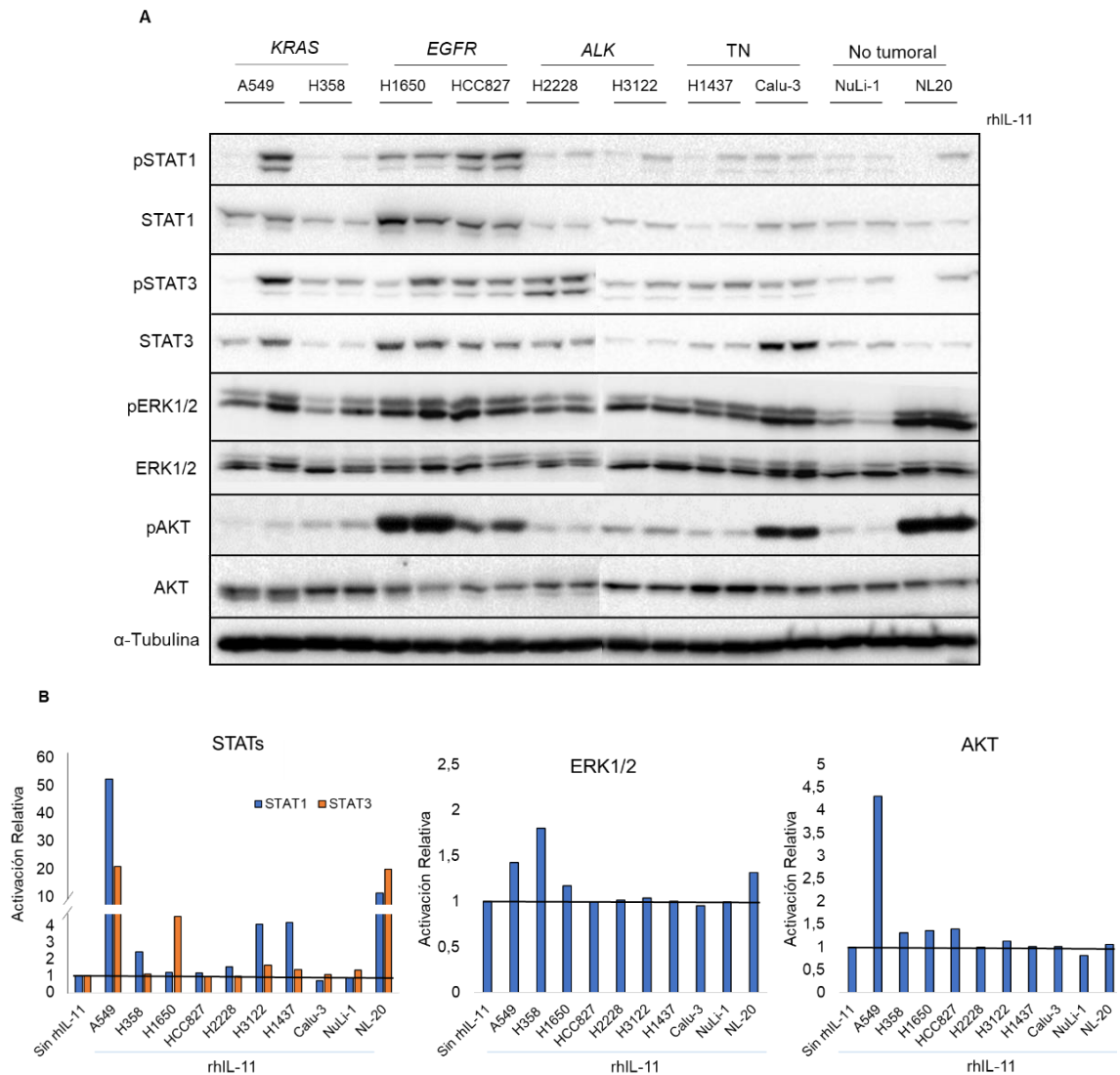


Figura 11. Efecto molecular de la estimulación con IL-11 en un panel de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Las 10 líneas celulares fueron estimuladas con 50 ng/ml de rhIL-11, durante 15 minutos (+). Tras dicha estimulación, se realizó la extracción de proteínas y se analizó por WB la fosforilación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT, usando como control sus formas totales y la α -tubulina (A). La normalización de la cuantificación de bandas se realizó en cada proteína fosforilada con respecto a la α -tubulina y, a su vez, con cada línea celular sin estimulación con rhIL-11. Valores superiores a 1 se corresponden con aumentos en la activación de la proteína analizada en la línea celular estimulada con rhIL-11 respecto a la misma línea sin estimular (B). El ensayo fue realizado por triplicado. La imagen mostrada es representativa de las réplicas y la cuantificación fue realizada en la réplica mostrada. KRAS=línea celular KRAS mutada, EGFR=EGFR mutada, ALK= portadora de translocación ALK-EML4, TN=triple negativa.

Para confirmar la activación de las vías de señalización analizadas, se sobre-expresó, mediante transfección, la subunidad específica del receptor de IL-11 (IL-11RA) en 5 de las 10 líneas celulares anteriormente estudiadas y, tras 5 horas de incubación con medio sin suero, se estimularon con rhIL-11 durante 15 minutos, tanto las células que sobre-expresaban el receptor (IL-11RA) como las transfectadas con el plásmido vacío (PV). Se observó mediante WB una marcada activación de STAT1 y STAT3 en las líneas celulares

que sobre-expresaban IL-11RA tras la estimulación con rhIL-11, respecto a la línea con plásmido vacío (Figura 12). Sin embargo, únicamente la línea NL-20 experimentó una ligera activación de ERK1/2 cuando la línea con sobre-expresión de IL-11RA fue estimulada con rhIL-11. Este resultado confirma que la ruta mayormente activada por IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón es la ruta JAK/STAT.

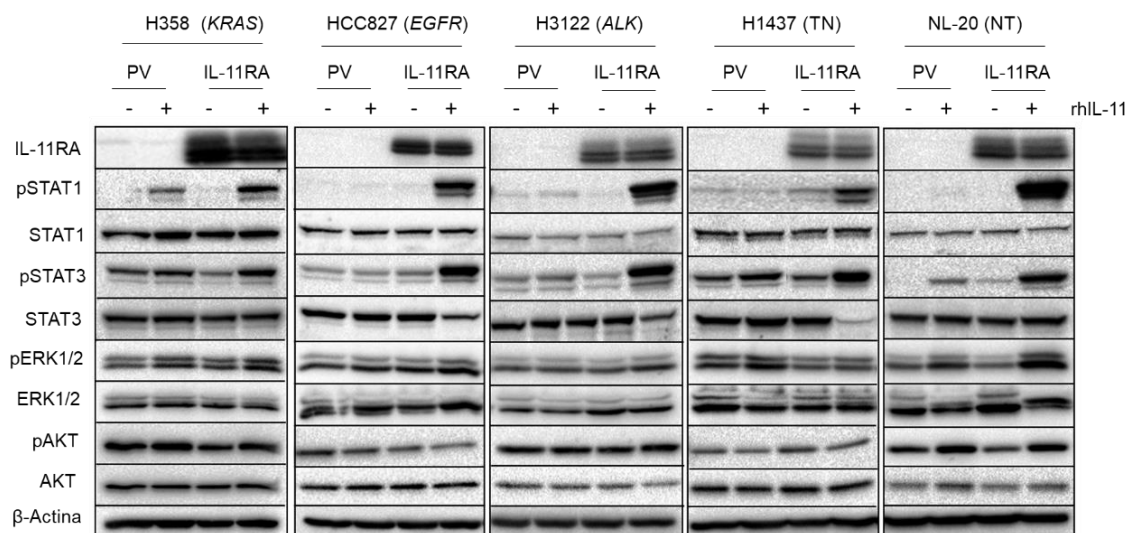


Figura 12. Efecto de la estimulación con IL-11 en la activación de diferentes rutas en un panel de líneas celulares con sobre-expresión de IL-11RA. Se estudió la activación de rutas analizando las formas fosforiladas de STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT en líneas celulares con sobre-expresión de IL-11RA o un vector vacío, estimuladas con rhIL-11. Los WB fueron realizados por triplicado y se representa una de las réplicas. PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11RA=línea celular con sobre-expresión de IL-11RA, rhIL-11=proteína recombinante humana IL-11. *KRAS*=línea celular *KRAS* mutada, *EGFR*=*EGFR* mutada, *ALK*=portadora de translocación *ALK-EML4*, TN=línea celular triple negativa, NT=línea celular no tumoral.

1.1.2. Efecto de la sobre-expresión de IL-11RA y su estimulación con rhIL-11 exógena *in vitro*

Para estudiar el efecto de IL-11 *in vitro*, se realizaron diversos ensayos subrogados en las líneas H358, HCC827, H3122 y H1437 con sobre-expresión de IL-11RA, con el objetivo de analizar diferentes propiedades tumorales de estas células: proliferación en presencia de suero y sin él, capacidad de formar colonias en condiciones de baja densidad celular (ensayo de clonabilidad) y capacidad de crecimiento libre de anclaje (crecimiento en agar blando).

Las líneas celulares con sobreexpresión de IL-11RA o de plásmido vacío se estimulaban con 100 ng/ml de rhIL-11, 3 veces por semana. La estimulación con rhIL-11 de la línea H358 que sobre-expresaba IL-11RA produjo un aumento significativo de la proliferación al 5% de SFB. En el resto de líneas celulares IL-11 no aumentó la proliferación (Figura 13A). En curvas de crecimiento al 0% de SFB IL-11 redujo la muerte

en ausencia de nutrientes en las líneas celulares H3122 y H1437 (Figura 13B). La estimulación con IL-11 también produjo un ligero aumento, aunque no estadísticamente significativo, en la capacidad de formar colonias en las líneas H3122 y H1437, que sobre-expresaban IL-11RA, en comparación con aquellas con el vector vacío. En las líneas H358 y HCC827 con sobre-expresión de IL-11RA la adición de rhIL-11 no tuvo ningún efecto (Figura 13C). Por último, en ensayos de agar blando, la estimulación con rhIL-11 aumentó ligeramente el número de colonias en las líneas H358 y HCC827 al sobre-expresar IL-11RA, mientras que no se observó ningún efecto en H3122 y H1437 (Figura 13D).

En vista del leve efecto observado en los ensayos subrogados realizados, las líneas H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11RA fueron activadas con rhIL-11, de la misma forma que se hizo para los ensayos funcionales. Es decir, se eliminó el SFB del medio de cultivo O/N y se estimuló con rhIL-11 en medio de cultivo al 5% de SFB y se realizaron extractos proteicos a distintos tiempos (15 minutos, 30 minutos, 1 hora y 8 horas) (Figura 14). Se comprobó por WB que la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 sólo se mantenía activa durante 30-60 minutos desde que se añadía IL-11 en las dos líneas que sobre-expresaban IL-11RA (Figura 14A-B). La corta duración de esta activación, producida por la adición exógena de rhIL-11, podría explicar los ligeros efectos funcionales observados en los ensayos subrogados, en los que la adición de IL-11 se hizo únicamente 3 días a la semana, durante 2-4 semanas, dependiendo del ensayo.

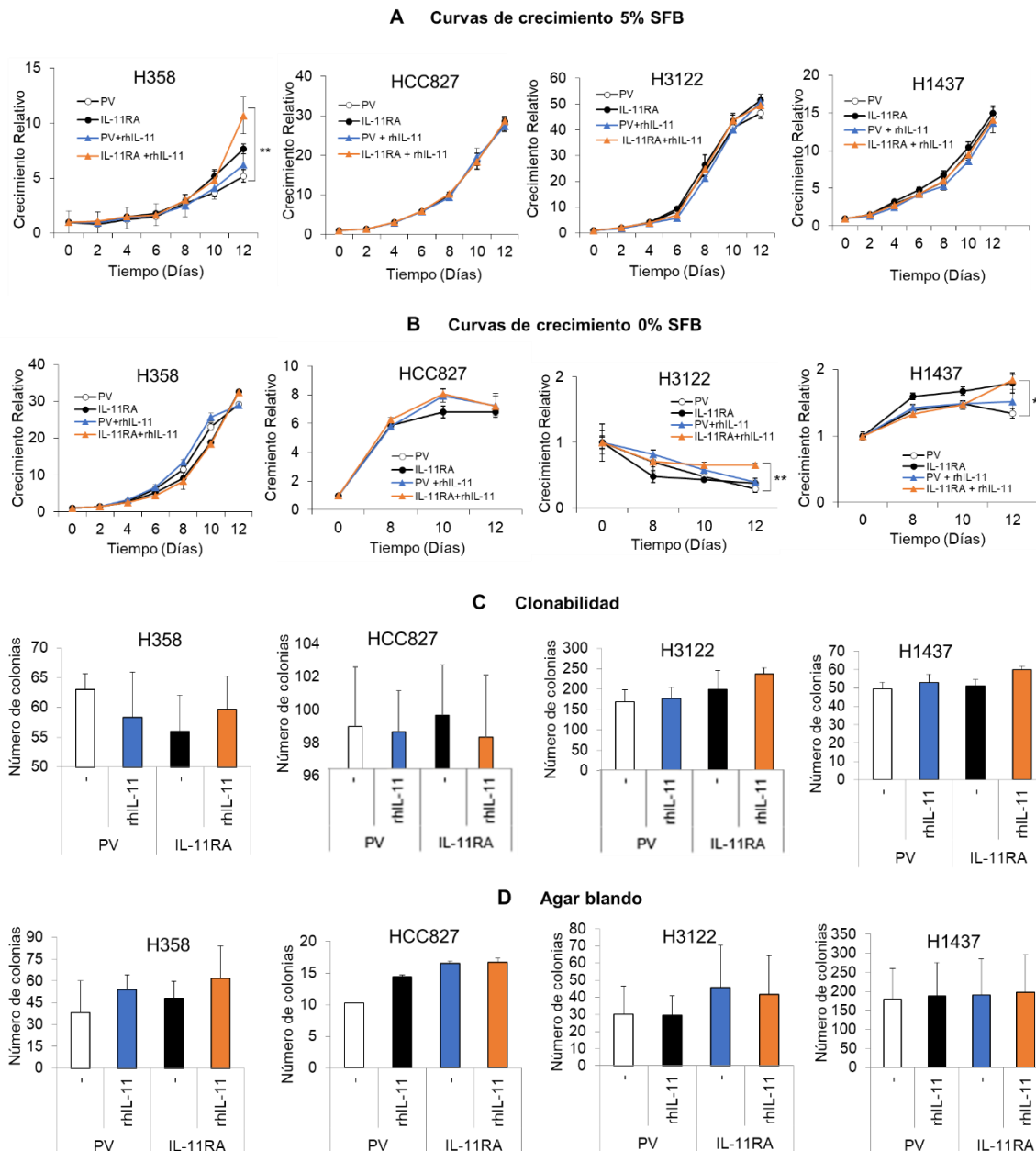


Figura 13. Efecto funcional de la estimulación con rhIL-11 en líneas celulares con IL-11RA sobre-expresado. Se realizaron ensayos subrogados de las líneas celulares H358, HCC87, H3122 y H1437 que sobre-expresaban IL-11RA o su correspondiente plásmido vacío, para analizar sus propiedades tumorales. En la condición con estimulación exógena con rhIL-11, se añadían 100 ng/ml de rhIL-11 al cultivo, 3 veces por semana durante el tiempo que durara el ensayo. Curvas de crecimiento al 5% de SFB (A) y al 0% de SFB (B). Ensayo de clonabilidad (C). Ensayo de agar blando (D). Los ensayos fueron realizados por triplicado. Las curvas de crecimiento mostradas son una réplica representativa del resultado. La media y la desviación típica de los ensayos de clonabilidad y agar blando se corresponden con las obtenidas en las tres réplicas. El análisis estadístico realizado fue el test Kruskal-Wallis. *($p < 0.05$) **($p < 0.01$). rhIL-11=línea celular estimulada con rhIL-11, PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11RA=línea celular con sobre-expresión de IL-11RA.

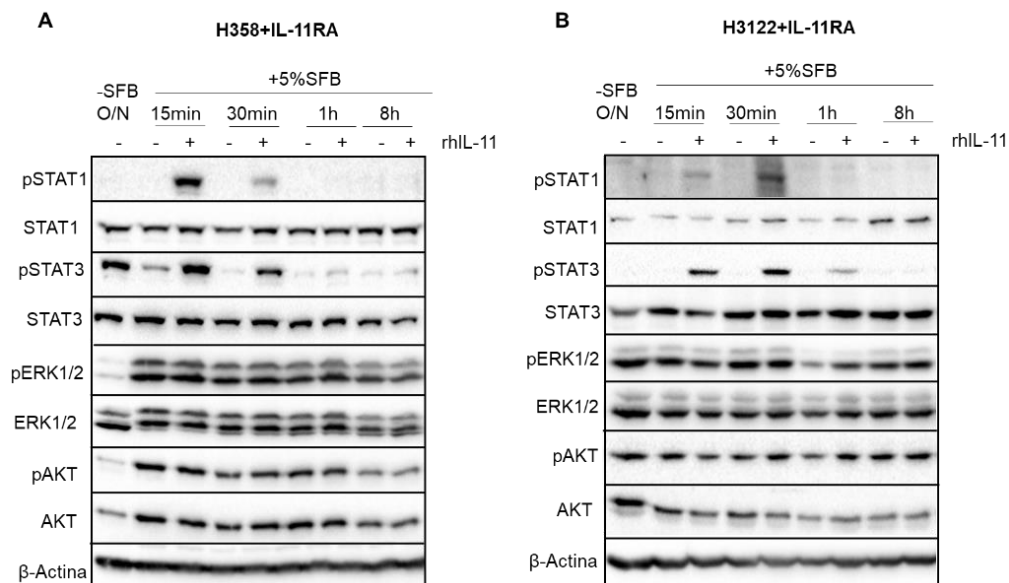


Figura 14. Duración de la estimulación de rhIL-11 exógena. Las líneas celulares H358 (A) y H3122 (B) con sobre-expresión de IL-11RA se incubaron sin SFB O/N y se estimularon con rhIL-11 (+) durante 15min, 30min, 1h y 8h. Se analizó por WB la activación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT.

1.1.3. Efecto de la sobre-expresión de IL-11 *in vitro*

Se generaron líneas con sobre-expresión de IL-11 con el objetivo de inducir un aporte constante endógeno de la citoquina y éste se confirmó analizando la secreción de IL-11 por ELISA (Figura 15A). A continuación, se caracterizó la duración de la activación de las rutas de señalización por WB (Figura 15B-C), y se realizaron ensayos subrogados para estudiar su efecto biológico (Figura 16).

A nivel molecular, en la línea H358 y en ausencia de suero la sobre-expresión de IL-11 activó STAT3, pero no STAT1. A las 24 horas de añadir suero, la activación de STAT1 y STAT3 fue ligeramente mayor en la condición de sobre-expresión de IL-11 con respecto a la condición con plásmido vacío (Figura 15B). En la línea H3122, la sobre-expresión de IL-11 en ausencia de suero aumentó significativamente la activación de STAT1, pero no de STAT3. Sin embargo, a las 24 horas de añadir suero al cultivo desapareció la diferencia en la activación de ambas proteínas entre la condición de sobre-expresión de IL-11 y el plásmido vacío (Figura 15C).

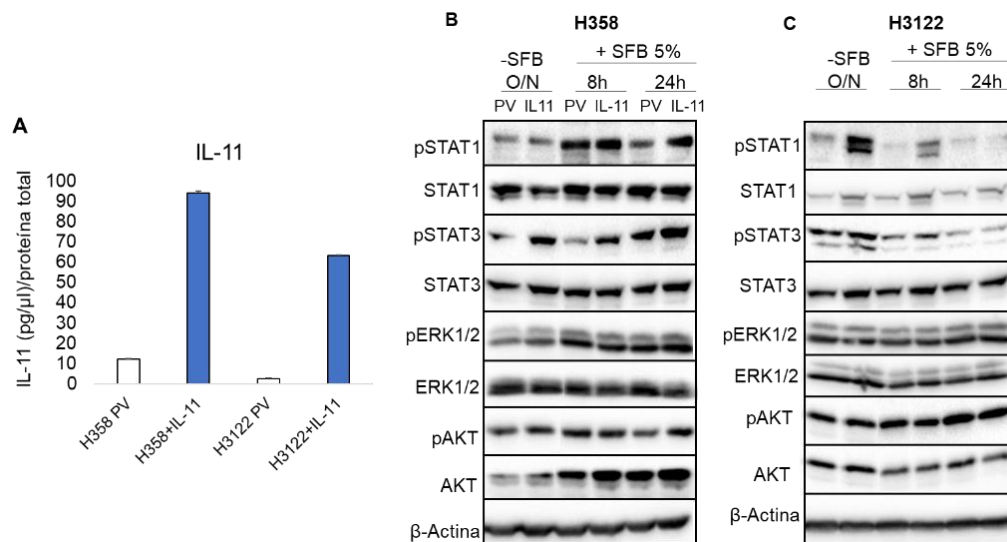


Figura 15. Efecto molecular de la sobre-expresión de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Comprobación por ELISA de la sobre-expresión de IL-11 en las líneas H358 y H3122 (A). Ambas líneas celulares se incubaron sin SFB O/N y se estimularon con medio al 5% de SFB durante 8h y 24h. Por WB se analizó la activación de vías de señalización en las líneas H358 (B) y H3122 (C). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11, SFB=suero fetal bovino.

La sobre-expresión de IL-11 aumentó ligera pero significativamente la proliferación al 5% de SFB en H358 con respecto a su plásmido vacío (Figura 16A) y al 0% de SFB en el caso de la línea H3122 (Figura 16B). Este resultado funcional concuerda con la activación observada de STAT3 en presencia de suero en la línea H358 y de STAT1 en ausencia de suero en la línea H3122. Además, IL-11 aumentó la capacidad de formación de colonias en la línea H3122 tanto en ensayos de clonabilidad (Figura 16C) como de agar blando (Figura 16D).

El ligero efecto biológico mostrado tras la sobre-expresión de IL-11 sugirió que dicho efecto podría haber sido más marcado si la sobre-expresión de IL-11 se acompañara de la de su receptor específico (IL-11RA).

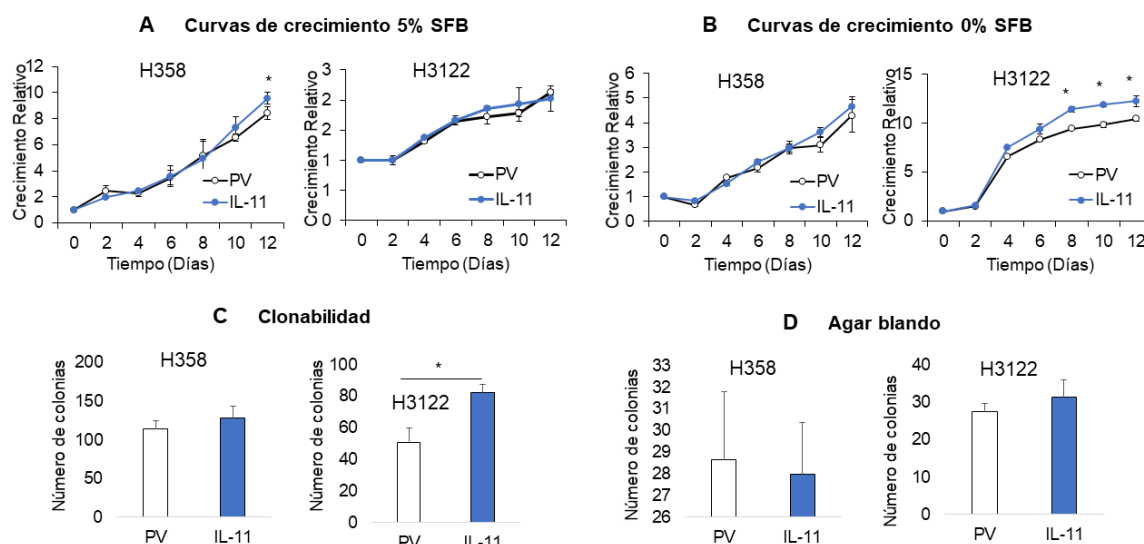


Figura 16. Efecto funcional de la sobre-expresión de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Se realizaron ensayos subrogados con las líneas celulares H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11 o su plásmido vacío. Curvas de crecimiento al 5% de SFB (A) y al 0% de SFB (B). Ensayos de clonabilidad (C). Ensayos de agar blando (D). Los ensayos fueron realizados por triplicado. En curvas de crecimiento se representa un experimento representativo de los tres ensayos. En ensayos de clonabilidad y agar blando se representan la media y la desviación estándar de las tres réplicas. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. * ($p < 0.05$). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11.

1.1.4. Co-sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA *in vitro*

Para co-sobre-expresar IL-11 e IL-11RA en la misma línea celular se realizaron co-transfecciones en 3 líneas celulares, H358, H3122 y NL-20. Estas líneas ya tenían sobre-expresado IL-11RA y fueron transfectadas con un plásmido de sobre-expresión de IL-11 con diferente antibiótico de selección. Tras realizar la selección de las células que habían integrado el plásmido, la sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA se comprobó por ELISA y WB respectivamente (Figura 17). En ninguno de los casos analizados ocurría la co-sobre-expresión de IL-11RA e IL-11RA. En la línea celular H358, sí se consiguió la sobre-expresión de IL-11 (Figura 17A), pero intentar verificar la sobre-expresión IL-11RA, ésta se había perdido (Figura 17B). En H3122 y NL-20, que sí conservaron la sobre-expresión de IL-11RA (Figura 17B), no se sobre-expresó IL-11 concomitantemente (Figura 17A). También se intentó sobre-expresar IL-11RA en la línea celular A549, la cual secreta de manera endógena niveles elevados de IL-11, y tras la selección confirmamos que el receptor tampoco se sobre-expresó (Figura 17C).

Este resultado sugiere que podrían existir mecanismos de regulación que impidieran que una misma célula exprese niveles elevados de IL-11 y de su receptor.

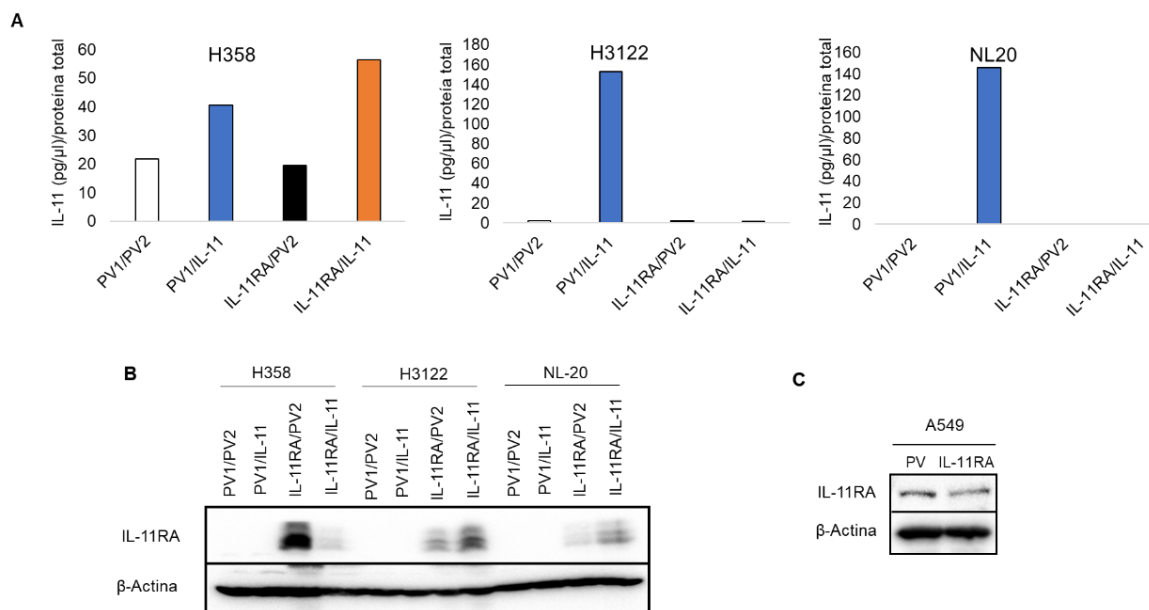


Figura 17. Co-sobre-expresión de IL-11RA e IL-11 en líneas celulares de pulmón. Las líneas celulares H358, H3122 y NL-20 previamente transfectadas con un plásmido vacío (PV1) o con sobre-expresión de IL-11RA fueron transfectadas de nuevo para introducir un plásmido de sobre-expresión de IL-11 o su plásmido vacío como control (PV2), con diferente antibiótico de selección. El resultado fue comprobado por ELISA, para analizar la expresión de IL-11 (A), y por WB, para confirmar que la sobre-expresión de IL-11RA se mantenía (B). Comprobación de sobre-expresión de IL-11RA en la línea celular A549 de alta expresión endógena de IL-11 (C). PV=plásmido vacío, IL-11=sobre-expresión de IL-11, IL-11RA=sobre-expresión de IL-11RA.

1.1.5. Efecto de la co-sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA mediante co-cultivos *in vitro* e *in vivo*

Como no fue posible sobre-expresar IL-11 y su receptor en la misma línea celular y dados los ligeros efectos biológicos observados tras sobre-expresar sólo IL-11 o su receptor y realizar estimulaciones exógenas con IL-11 de corta duración, se realizaron co-cultivos utilizando las líneas celulares con sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA, tanto *in vitro* (Figuras 18-19) como *in vivo* (Figura 20).

Las líneas H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11RA se sembraron en placas de 6 pocillos y se co-cultivaron con la misma línea celular con sobre-expresión de IL-11 o con plásmido vacío en *transwells*. Para comprobar que la IL-11 que secretaba la célula que la sobre-expresaba estaba llegando a la célula con sobre-expresión del receptor, se realizó un ELISA en los sobrenadantes de cultivos del compartimento inferior del co-cultivo. Aunque la línea celular con sobre-expresión de IL-11 estaba secretando esta citoquina, la concentración a la que llegaba a la línea celular con sobre-expresión de IL-11RA era marcadamente más baja que en la condición de sobre-expresión en un cultivo simple (Figura 18A). Este aporte de IL-11 podría no ser suficiente para inducir una respuesta en la línea celular con sobre-expresión de IL-11RA. Por ello, revisamos si esa

IL-11 estaba activando las vías de señalización y ejerciendo un efecto biológico. No se observó activación por parte de IL-11 en ninguna de las vías de señalización analizadas, lo que puede indicar que la IL-11 aportada por la línea celular que la sobre-expresaba podría no ser suficiente para provocar cambios en la línea celular con sobre-expresión de IL-11RA bajo las condiciones analizadas (Figura 18B).

A continuación, se realizaron curvas de crecimiento al 5% y al 0% de SFB y ensayos de clonabilidad en los co-cultivos descritos y no se encontraron diferencias significativas entre la línea con sobre-expresión de IL-11RA co-cultivada con células que sobreexpresan IL-11 o con la línea celular con su correspondiente plásmido vacío (Figura 19A-C). Este resultado sugiere que la concentración de IL-11 alcanzada con los co-cultivos *in vitro* podría haber sido insuficiente para activar las vías de señalización de IL-11 y, por tanto, tampoco fue suficiente para producir un efecto biológico.

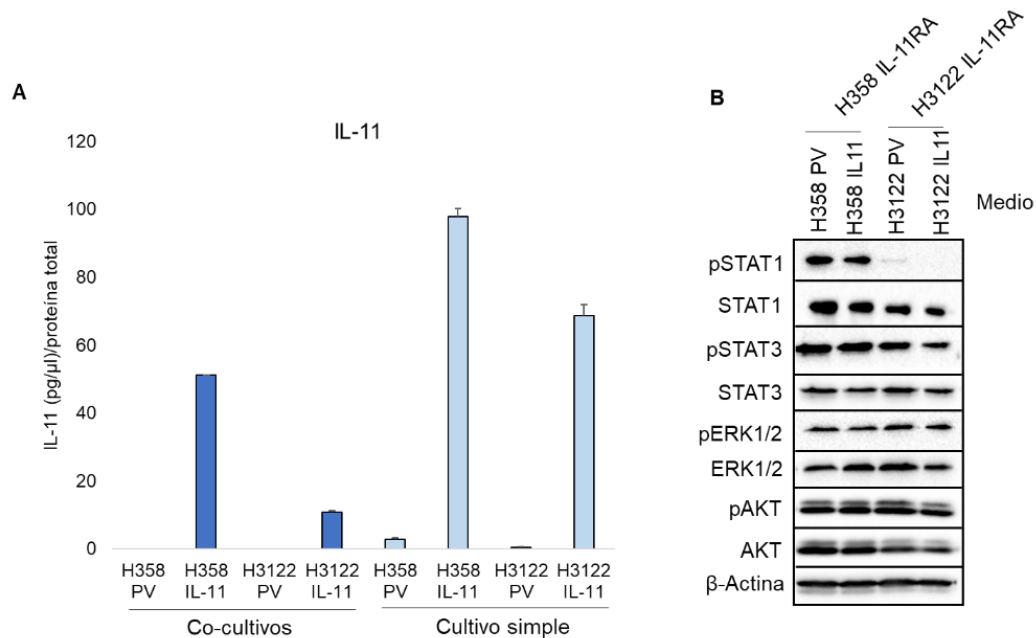


Figura 18. Efecto molecular del co-cultivo de células con sobre-expresión de IL-11RA e IL-11. Las líneas celulares H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11RA fueron co-cultivadas, separadas por *transwells*, con la misma línea sobre-expresando IL-11 o su plásmido vacío, en medio de cultivo al 5% de SFB. Tras 24 horas, se analizó el sobrenadante del compartimento inferior por ELISA (A) y se realizaron extractos proteicos de las líneas con sobre-expresión de IL-11RA para comprobar la activación de vías de señalización por WB (B). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11, IL-11RA=línea celular con sobre-expresión de IL-11RA.

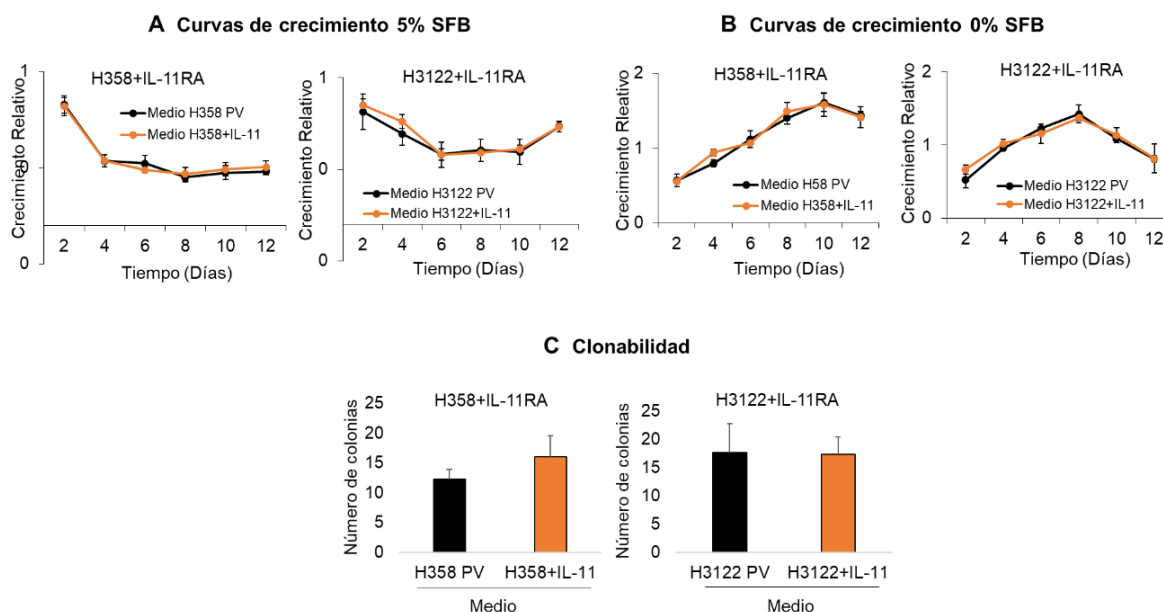


Figura 19. Ensayos subrogados en co-cultivos de células con sobre-expresión de IL-11RA y de IL-11 *in vitro*. Las líneas celulares H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11RA fueron co-cultivadas mediante *transwells* con la misma línea celular con sobre-expresión de IL-11 o su plásmido vacío. Se realizaron curvas de crecimiento al 5% (A) y al 0% (B), y ensayo de clonabilidad (C) a la línea con sobre-expresión del receptor que estaba recibiendo IL-11 del co-cultivo. PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11, IL-11RA=línea celular con sobre-expresión de IL-11RA.

Debido a que *in vitro* había limitaciones para estudiar el efecto de la sobre-expresión de IL-11, se realizaron ensayos *in vivo* en los cuales se generaron xenoinjertos subcutáneos en ratones inmunodeprimidos, co-inyectando las líneas celulares H358 y H3122 con sobre-expresión de IL-11 y/o sobre-expresión de IL-11RA o su plásmido vacío, en todas sus combinaciones posibles (PV, PV/IL-11RA, PV/IL-11, IL-11/IL-11RA). Las células que sobre-expresaban IL-11 producían tumores de un tamaño ligeramente mayor que las que tenían sobre-expresión de IL-11RA y aquellas con plásmido vacío, las cuales crecían por igual. Los tumores de mayor tamaño se correspondieron con la co-inyección de células que sobre-expresaban IL-11 junto con células que sobre-expresaban IL-11RA en ambas líneas celulares. Mediante tinciones de IHQ se comprobó el estado de activación de STAT3 y la expresión de los marcadores de proliferación Ki67 y Ciclina D1 en los tumores generados por líneas celulares con plásmido vacío o con la co-inyección de células con sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA (Figura 20C-D). El caso de H358, los tumores generados por la co-inyección de células con sobre-expresiones de ambas proteínas mostraron un aumento de la fosforilación de la proteína STAT3 y de la expresión de Ciclina D1 con respecto a la condición con plásmido vacío. No se observaron diferencias en la expresión de Ki67 (Figura 20C). En H3122, la co-inyección de células con sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA dio lugar a tumores con mayor activación de STAT3 y más expresión de Ki67 y CiclinaD1 (Figura 20D).

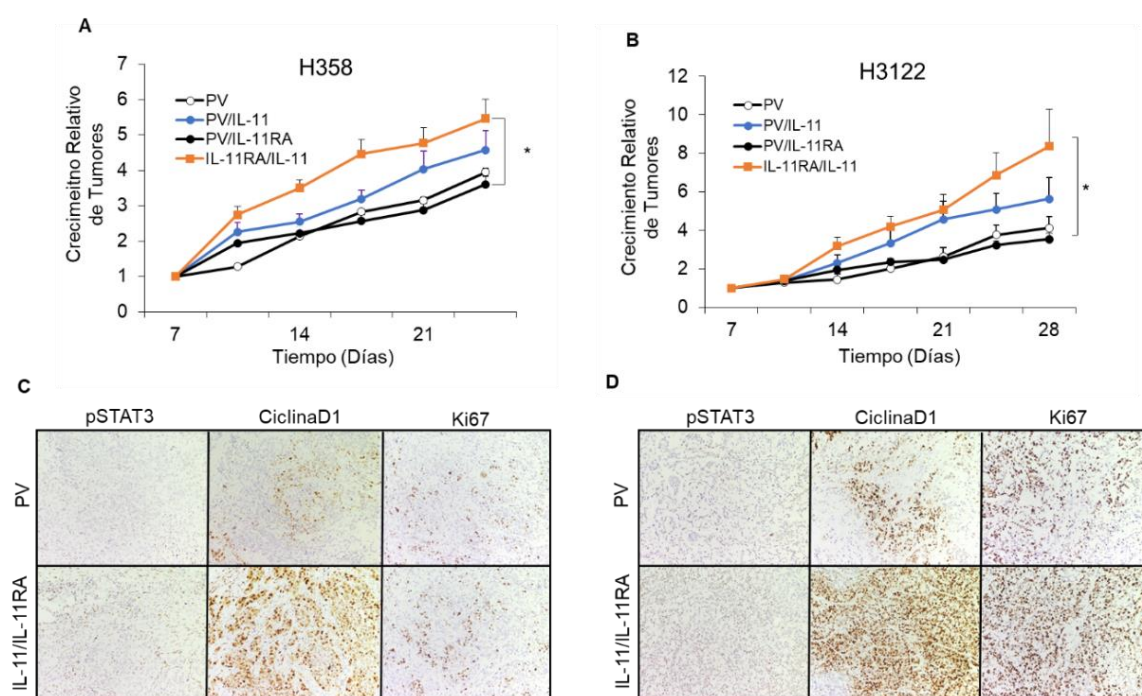


Figura 20. Co-inyección de células con sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA *in vivo*. Se realizaron ensayos *in vivo* de co-inyección de las líneas celulares H358 (A) y H3122 (B) con sobre-expresión de IL-11 y/o IL-11RA, además de su plásmido vacío, en ambos flancos de ratones atímicos en todas las combinaciones posibles (PV, PV/IL-11RA, PV/IL-11/IL-11/IL-11RA). Los tumores generados fueron medidos semanalmente. Se incluyeron 5 ratones por grupo (N=5). Se analizó la expresión de las proteínas pSTAT3, Ki67 y Ciclina D1 por tinciones de IHQ en los tumores generados por H358 (C) y H3122 (D). Las tinciones de IHQ se realizaron en 3 tumores de 3 ratones por grupo y se muestra uno de ellos, representativo del resultado. El análisis estadístico realizado fue el test Kruskal-Wallis. *($p < 0.05$). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11, IL-11RA=línea celular con sobre-expresión de IL-11RA.

Los resultados obtenidos indican que IL-11 puede promover el crecimiento del tumor *in vivo*, especialmente si además hay células tumorales que sobre-xpresan la subunidad específica de su receptor en el mismo tumor. El hecho de que el efecto observado *in vivo* sea más marcado que el visto *in vitro*, sugiere que IL-11 podría no solo estar jugando un papel directo sobre la célula tumoral, sino también un papel indirecto sobre el componente celular del microambiente y estroma del tumor.

1.1.6. Efecto del silenciamiento de IL-11 *in vitro* e *in vivo*

Se realizó el silenciamiento de la expresión de IL-11, mediante tecnología CRISPR-cas9, en las 2 líneas celulares que más IL-11 secretaban, A549 y H1975, y se confirmó por ELISA (Figura 21A). A continuación, se comprobó cómo el silenciamiento influía en la activación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT. Para ello, la línea celular con silenciamiento de IL-11 y su correspondiente control, con expresión del plásmido vacío, fueron incubadas O/N sin suero, para sincronizar las células, y posteriormente estimularlas con suero al 5%. Se recogieron extractos proteicos a distintos tiempos (8 y

24 horas) y se analizó la activación de las vías por WB. El silenciamiento de IL-11 disminuyó significativamente la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 (Figura 21B). Este efecto fue más prolongado que la activación vista al sobre-expresar IL-11 (Figura 15B-C) se acompañó de la reducción de las proteínas de proliferación y apoptosis Ciclina D1, p21 y BCL2 (Figura 21D).

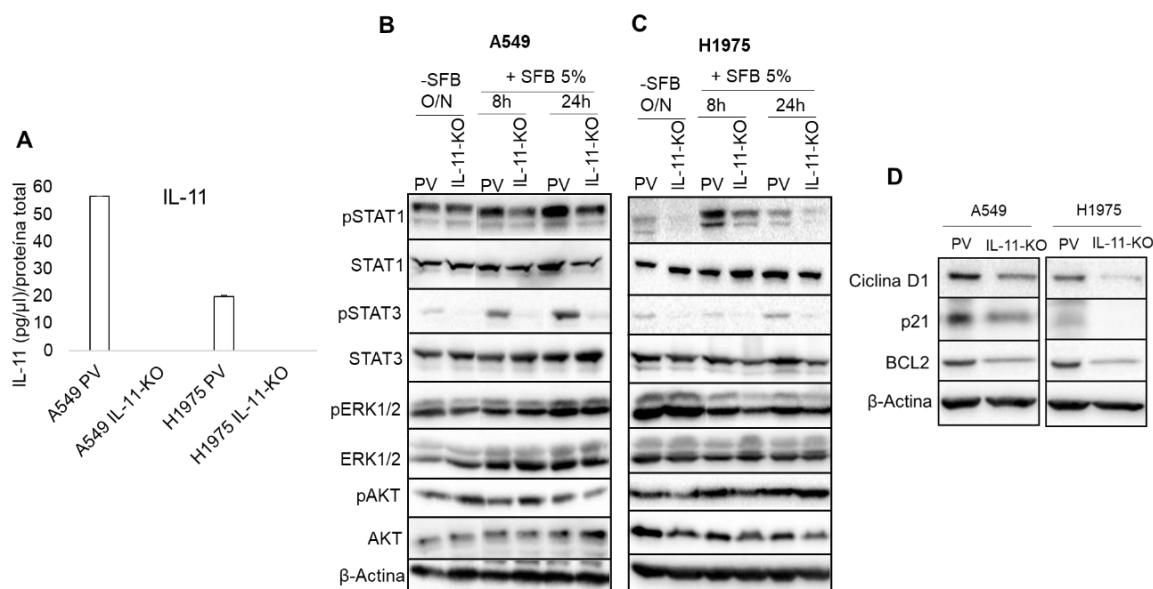


Figura 21. Efecto molecular del silenciamiento de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Comprobación del silenciamiento de IL-11 mediante ELISA en sobrenadantes de líneas celulares (A). Las líneas celulares A549 (B) y H1975 (C) se incubaron sin SFB O/N y se estimularon con medio al 5% de SFB durante 8h y 24h. Por WB se analizó la activación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT. Las células con silenciamiento de IL-11 y con expresión del plásmido vacío fueron incubadas O/N sin suero y se estimularon con suero durante 24 horas, tras lo cual se realizaron extractos proteicos. Se estudió la expresión de las proteínas Ciclina D1, p21 y BCL2 por WB (D). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11, SFB=suero fetal bovino.

Seguidamente, para analizar el efecto biológico de ese silenciamiento, se llevaron a cabo los siguientes ensayos funcionales: curvas de crecimiento al 5% y 0% de SFB, ensayos de clonabilidad, ensayos de agar blando y ensayos de migración celular. El silenciamiento de IL-11 redujo significativamente la mayoría de las propiedades tumorales estudiadas en ambas líneas celulares (Figura 22). En la línea A549, el silenciamiento de IL-11 no produjo cambios en la capacidad de proliferación (Figura 22A) pero disminuyó significativamente la muerte de células al 0% de SFB (Figura 22B), la capacidad de formar colonias en baja densidad (Figura 22C) y en agar blando (Figura 22D), y la capacidad de migración (Figura 22E). En el caso de la línea H1975, el silenciamiento de IL-11 disminuyó significativamente el crecimiento al 5% y 0% de SFB (Figura 22A-B), además de disminuir también el número de colonias en el ensayo de clonabilidad (Figura 22C) y la capacidad de migración (Figura 22E). No se observó efecto del silenciamiento de IL-11 en la formación de colonias en agar blando en esta línea celular (Figura 22D).

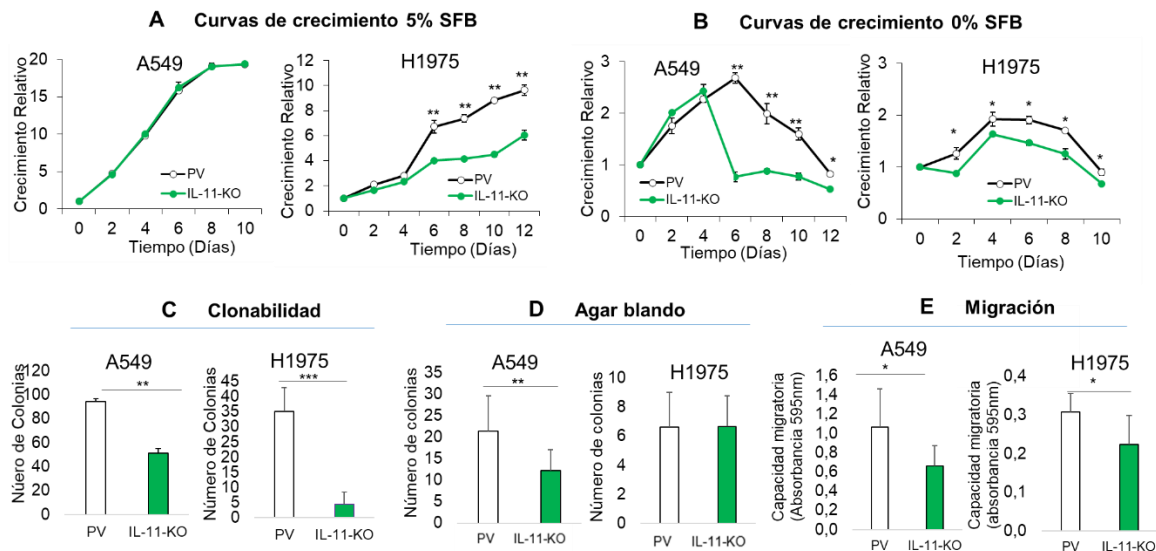


Figura 22. Efecto funcional del silenciamiento de IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Las líneas celulares A549 y H1975 fueron silenciadas para la expresión de IL-11 y se realizaron curvas de crecimiento al 5% (A) y al 0% de SFB (B). Ensayos de clonabilidad (C). Ensayos de agar blando (D). Ensayos de migración (E). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las gráficas de las curvas de crecimiento se corresponden con una de las réplicas, representativa del resultado. Las gráficas del resto de ensayos fueron obtenidas calculando la media y la desviación estándar de las tres réplicas. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). PV=línea con plásmido vacío, IL-11-KO =línea celular con silenciamiento de IL-11.

Utilizamos las células con silenciamiento de IL-11 para realizar ensayos *in vivo* de generación de *xenografts* en ratones atímicos. Se comprobó que la línea celular A549 formó tumores de mucho menor tamaño cuando las células no secretaban IL-11 (Figura 23A) y, en el caso de la línea celular H1975 con silenciamiento de IL-11, se generaron tumores pequeños que no llegaron a crecer (Figura 23B). Al comprobar por tinciones de IHQ la activación de la vía JAK/STAT, en los tumores generados por la línea A549 con silenciamiento de IL-11 se observó una disminución de la fosforilación STAT3, así como una disminución de la expresión de Ki67 y Ciclina D1 (Figura 23B). En los tumores generados por la línea celular H1975 no se observaron diferencias en la expresión de pSTAT3, pero sí disminuyó la expresión de Ciclina D1 y Ki67 en los tumores con silenciamiento de IL-11 (Figura 23D).

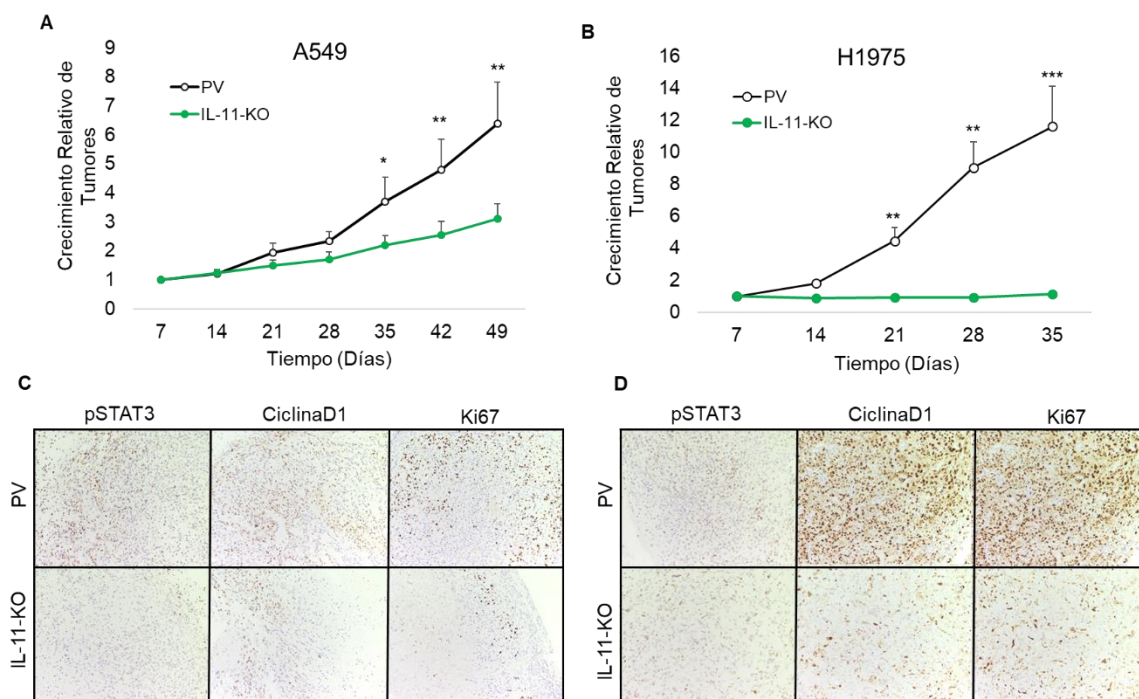


Figura 23. Efecto del silenciamiento de IL-11 en el crecimiento de tumores *in vivo*. Las líneas celulares A549 (A) y H1975 (B) con silenciamiento de IL-11 y con expresión del plásmido vacío, fueron inyectadas subcutáneamente en ambos flancos de ratones atímicos, incluyendo 5 ratones por grupo (N=5). El volumen de los tumores fue medido semanalmente y se realizaron tinciones de IHQ para comprobar la activación de STAT3, además de la expresión Ciclina D1 y Ki67 en los tumores generados por A549 (C) y H1975 (D). Las tinciones de IHQ se realizaron en tres tumores por cada condición y se muestra uno de ellos, representativo del resultado. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11.

1.1.7. Efecto del silenciamiento de IL-11RA *in vitro* e *in vivo*

Para estudiar si el efecto del silenciamiento de IL-11 se reproducía silenciando la subunidad específica de su receptor y asegurarnos de que era un efecto *on-target*, se realizó el silenciamiento de IL-11RA en la misma línea celular A549. Como el anticuerpo de IL-11RA no mostraba excesiva especificidad y era difícil asegurarse por WB que el silenciamiento había ocurrido con éxito, para comprobar dicho silenciamiento se estimularon los clones silenciados generados con rhIL-11 y se analizó la activación de STAT1 y STAT3 por WB. Se consideró que había silenciamiento en aquellos clones en los que no se producía activación de STAT1 y STAT3 tras estimular con rhIL-11, en comparación con el vector vacío en el cual sí había activación de ambas proteínas (Figura 24A).

Se analizó la activación de vías de señalización en la línea celular con silenciamiento de IL-11RA y con el plásmido vacío. Para ello, el cultivo se sincronizó incubándolo sin suero O/N y añadiendo posteriormente suero al 5% para realizar la extracción de proteínas 24 horas después (Figura 24B). Por WB se comprobó que, al igual que ocurría

en esta misma línea con silenciamiento de IL-11, la fosforilación de STAT1 y STAT3 era menor en la línea A549 con silenciamiento de IL-11RA, en comparación con el plásmido vacío.

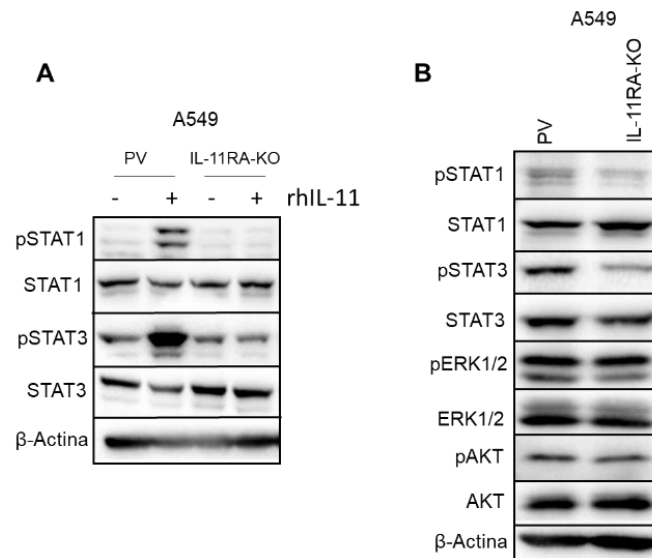


Figura 24. Efecto molecular del silenciamiento de IL-11RA en la línea celular A549. Se silenció la expresión de IL-11RA por tecnología CRISPR-cas9 en la línea celular A549 y se comprobó dicho silenciamiento por la no activación de su vía por WB. Las células se incubaron 5 horas sin SFB y se estimularon con rhIL-11. A los 15 minutos se realizó la extracción de proteínas para analizar la activación de STAT1 y STAT3 (A). La línea A549 con silenciamiento de IL-11RA y con el plásmido vacío fue incubada O/N sin suero y posteriormente se añadió suero al 5%. Pasadas 24 horas se realizaron extractos proteicos para analizar la activación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT. PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11RA-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11RA.

Con el clon silenciado para la expresión de IL-11RA se analizó el efecto del silenciamiento de IL-11RA sobre las propiedades tumorales, mediante la realización de ensayos subrogados (Figura 25). El silenciamiento de IL-11RA disminuyó la proliferación con y sin suero (Figura 25A-B), y la capacidad de formar colonias en ensayos de clonabilidad (Figura 25C) y de agar blando (Figura 25D). No se encontraron diferencias significativas en el ensayo de migración (Figura 25E).

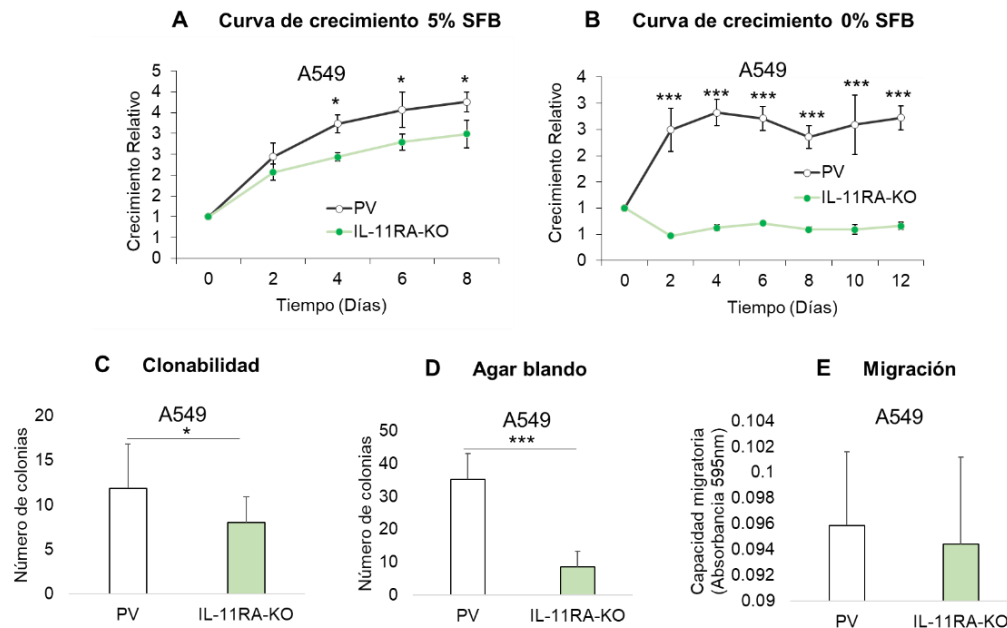


Figura 25. Efecto del silenciamiento de IL-11RA *in vitro*. Se silenció la expresión de IL-11RA en la línea celular A549 y se realizaron los siguientes ensayos subrogados: Curvas de crecimiento al 5% de SFB (A), curvas de crecimiento al 0% de SFB (B), ensayos de clonabilidad (C), ensayos de agar blando (D) y ensayos de migración (E). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las gráficas de las curvas de crecimiento se corresponden con una de las réplicas, representativa del resultado. Las gráficas del resto de ensayos fueron obtenidas calculando la media y la desviación estándar de las tres réplicas. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$). PV=línea con plásmido vacío, IL-11RA-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11RA.

Realizamos ensayos *in vivo*, de generación de modelos *xenografts*, y observamos que la línea celular A549 con silenciamiento de la expresión de IL-11RA produjo tumores de menor tamaño que la línea celular control, con expresión del plásmido vacío (Figura 26A). Por tinciones de IHQ se comprobó que en los tumores con silenciamiento de IL-11RA tanto la fosforilación de STAT3 como la expresión de Ciclina D1 y Ki67 disminuyeron significativamente (Figura 26B).

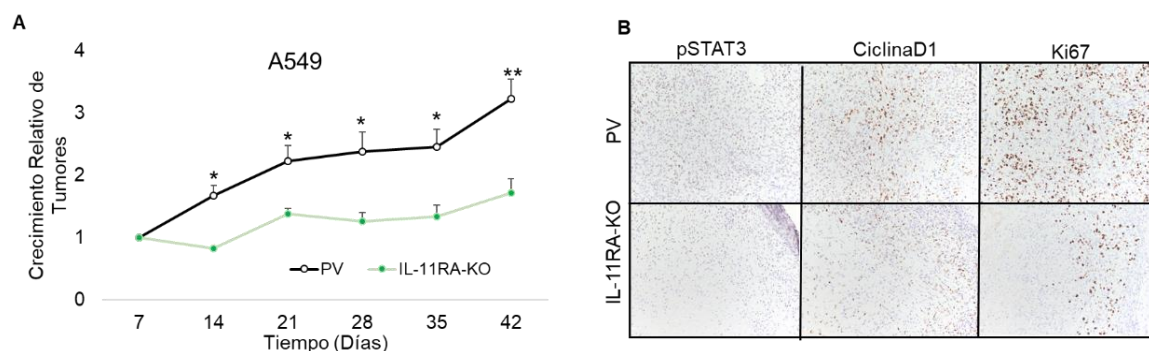


Figura 26. Efecto del silenciamiento de IL-11RA en el crecimiento de tumores *in vivo*. La línea celular A549 con silenciamiento de IL-11 y con el plásmido vacío fue inyectada subcutáneamente en ambos flancos de ratones atímicos, incluyendo 5 ratones por grupo (N=5). El volumen de los tumores fue medido semanalmente (A) y se realizaron tinciones de IHQ para comprobar la activación de STAT3, además de la expresión Ciclina D1 y Ki67 en los tumores generados (B). Las tinciones de IHQ se realizaron en tres tumores por cada condición y se muestra uno de ellos, representativo del resultado. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). PV=línea celular con plásmido vacío, IL-11RA-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11RA.

1.2. Papel de il-11 en el estroma tumoral *in vitro*

Se analizó la expresión IL-11 y sus subunidades receptoras en un panel de líneas celulares primarias provenientes de CAFs de pacientes con adenocarcinoma de pulmón cedidos por el Dr. Alejandro Sweet-Cordero (Universidad de California en San Francisco, UCSF). Elegimos trabajar con estos CAFs porque habían sido caracterizados por ARNseq (Figura 27A) y expresaban niveles de IL-11 más elevados, en comparación con los fibroblastos normales del mismo paciente. Por ELISA se analizó la secreción de IL-11 por parte de los CAFs, además de en la línea celular de fibroblastos primarios pulmonares LC5, generados en el laboratorio del Dr. Gabriel Criado (Instituto de Investigación i+12) (Figura 27B). Comprobamos que todas las líneas celulares de fibroblastos secretaban IL-11 y, además, en el ELISA se incluyó el sobrenadante de la línea celular A549, para poder comparar la secreción de IL-11 por los fibroblastos con la detectada anteriormente (Figura 10) en las todas las líneas celulares del panel. Los CAFs secretaron más IL-11 que las células tumorales de adenocarcinoma de pulmón (Figura 27C). Este resultado sugiere que los fibroblastos podrían ser una fuente relevante de IL-11 en los tumores pulmonares. Además, se determinó la expresión de IL-11RA y GP130 en las líneas celulares anteriores y todos los fibroblastos expresaban ambas proteínas, por lo que no solo son fuente de IL-11 sino que también podrían responder a su estímulo (Figura 27D).

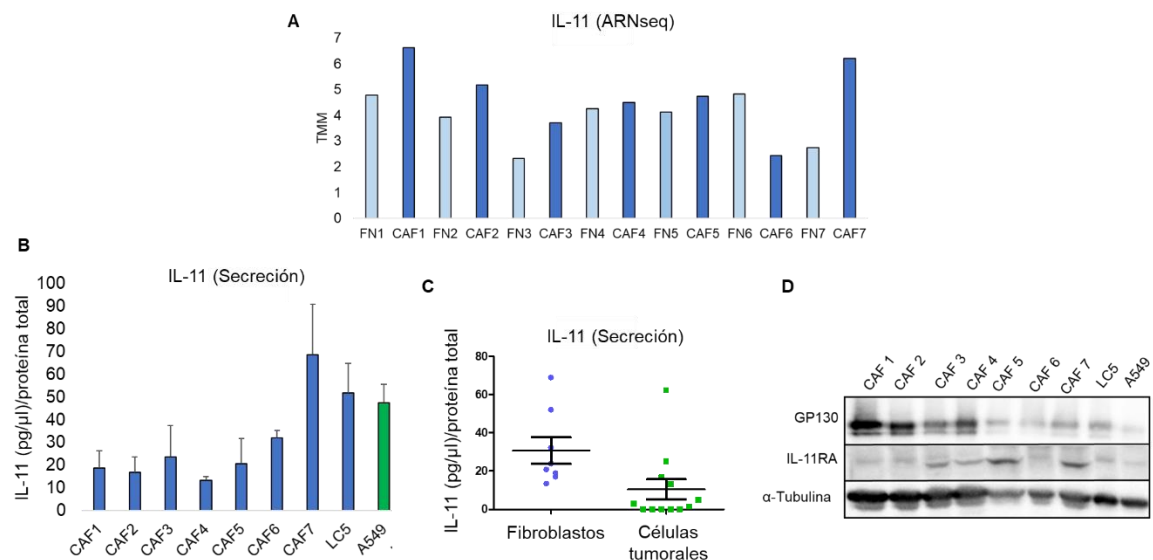


Figura 27. Caracterización de un panel de líneas celulares de fibroblastos para la expresión de IL-11 y sus subunidades receptoras. Mediante ARNseq se analizó la expresión IL-11 de un panel de fibroblastos normales y CAFs aislados de pacientes con adenocarcinoma de pulmón (análisis llevado a cabo en el laboratorio del Dr. A. Sweet-Cordero) (A). Por ELISA se analizó la secreción de IL-11 por CAFs, fibroblastos pulmonares LC5 y la línea celular tumoral A549 (B). Se comparó la secreción de IL-11 por parte de los fibroblastos respecto a la de las líneas tumorales analizada anteriormente (apartado 1.1.1) (C). La expresión de las proteínas GP130 e IL-11RA en los fibroblastos fue analizada por WB (D). Tanto el ELISA como el WB fueron realizados por triplicado. La media y desviación típica se calcularon con las réplicas. El WB es representativo de los resultados obtenidos. FN=Fibroblasto normal, CAF=fibroblasto asociado a tumor.

Posteriormente, se analizó, por medio de experimentos con medios condicionados, la influencia que las células tumorales podrían tener sobre las células del estroma. Para ello, se cultivaron CAFs con el medio en el que habían estado creciendo las líneas celulares tumorales A549 y H358 y se analizó la expresión de IL-11 por RT-qPCR (Figura 28). Así, vimos que el medio de crecimiento de las líneas celulares tumorales, y por tanto su secretoma, indujo un aumento de la expresión de IL-11 por parte de los CAFs.

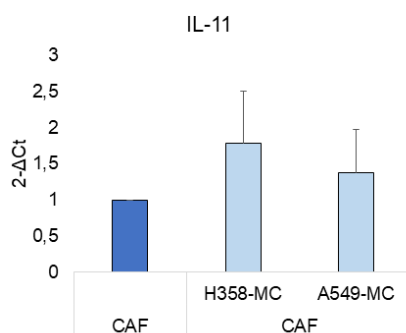


Figura 28. Efecto del secretoma de las células tumorales en la expresión de IL-11 por parte de los CAFs. Los CAFs se mantuvieron durante 48 horas en cultivo con medio proveniente de las células tumorales H358 y A549. Se realizó RT-qPCR para analizar la expresión de IL-11 por parte de los CAFs bajo las condiciones anteriores. Los ensayos fueron llevados a cabo por triplicado y se representan la media y la desviación estándar de dichas réplicas. CAF=fibroblasto asociado a tumor, MC=medio condicionado.

Con el objetivo de estudiar las vías de señalización activadas por IL-11 en los fibroblastos, las líneas celulares CAF1 y LC5 se cultivaron durante 5 horas sin suero y fueron estimuladas con rhIL-11 durante 15 minutos, tras lo cual se realizó la extracción de proteínas y el análisis por WB de posibles cambios en las rutas JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT (Figura 28). La estimulación exógena con IL-11 aumentó la fosforilación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT, confirmando que los fibroblastos responden a la estimulación con IL-11.

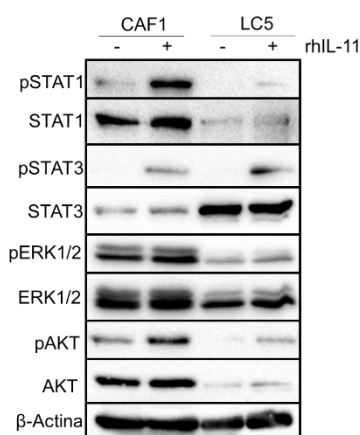


Figura 29. Efecto molecular de la estimulación con IL-11 en líneas celulares de fibroblastos. Las líneas de fibroblastos CAF1 y LC5 fueron estimuladas, tras estar 5h sin suero, con 50ng/ml de rhIL-11, durante 15 minutos (+). Tras dicha estimulación, se realizó la extracción de proteínas y se analizó por WB la fosforilación de las proteínas STAT1, STAT3, ERK1/2 y AKT (A). rhIL-11=proteína recombinante IL-11

Para estudiar el efecto funcional que IL-11 producía directamente sobre los fibroblastos, se generó una línea celular de fibroblastos LC5 con silenciamiento de IL-11 y, tras confirmar dicho silenciamiento por ELISA (Figura 30A), se realizaron ensayos subrogados (Figura 30B-E). No se observaron diferencias en proliferación mediante curvas de crecimiento con suero (Figura 30B), pero el silenciamiento de IL-11 disminuyó tanto la proliferación en ausencia de suero (Figura 30C) como la capacidad de migración (Figura 30E), y redujo el tamaño de las colonias en el ensayo de clonabilidad, aunque no el número (Figura 30D).

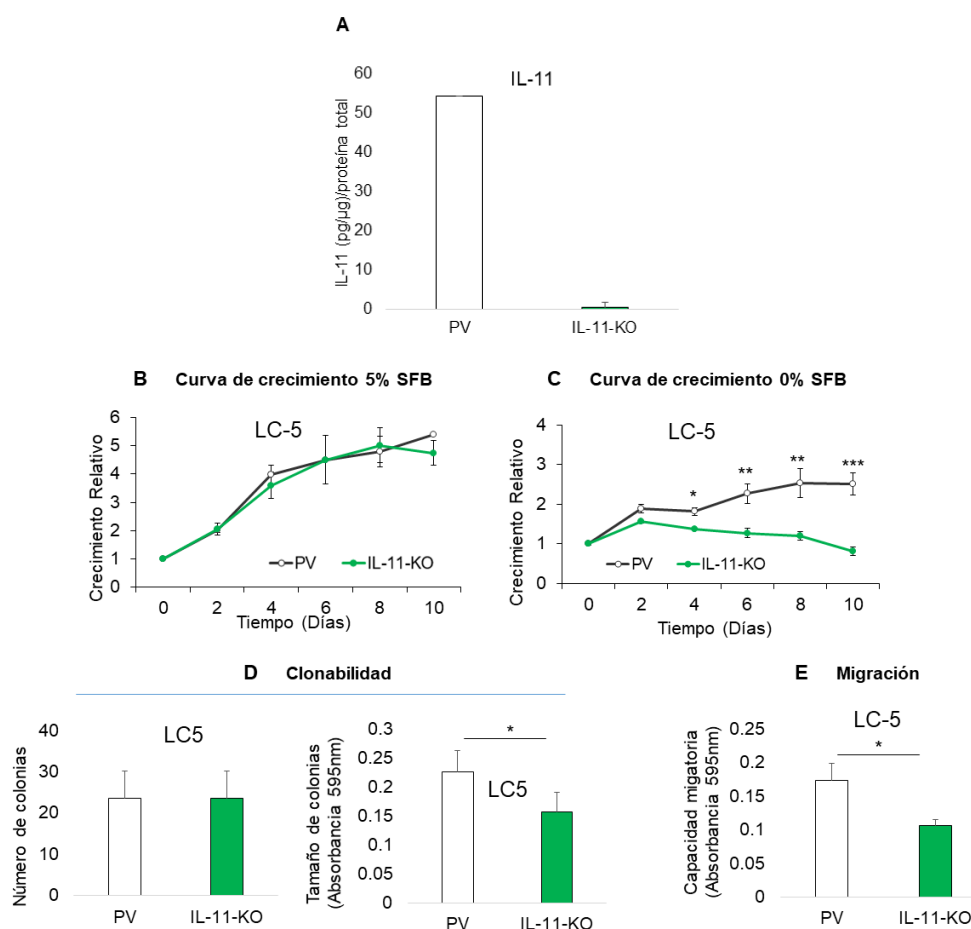


Figura 30. Efecto funcional del silenciamiento de IL-11 en fibroblastos pulmonares *in vitro*. Se silenció la expresión de IL-11 en la línea celular LC5 y se comprobó dicho silenciamiento por ELISA (A). Se realizaron curvas de crecimiento al 5% de SFB (B), curvas de crecimiento al 0% de SFB (C), ensayos de clonabilidad (D), ensayos de migración (E). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado. Las gráficas de las curvas de crecimiento se corresponden con una de las réplicas, representativa del resultado. Las gráficas del resto de ensayos fueron obtenidas calculando la media y la desviación estándar de las tres réplicas. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. *($p < 0.05$), **($p < 0.01$), ***($p < 0.001$). PV=línea con plásmido vacío, IL-11-KO =línea celular con silenciamiento de IL-11.

En virtud de los resultados obtenidos, IL-11 parece influenciar la proliferación y la migración de fibroblastos, lo cual podría tener un efecto indirecto sobre la progresión tumoral.

Para estudiar la influencia que IL-11 podría tener sobre el secretoma de los fibroblastos, además de la línea de fibroblastos LC5 con silenciamiento de IL-11, se generó la misma línea con sobre-expresión de IL-11 o su correspondiente plásmido vacío, confirmando la sobre-expresión por ELISA (Figura 31A). Se utilizaron estas líneas para comprobar cómo la expresión de IL-11 influía en el perfil de secreción de un panel de 44 citoquinas o factores de crecimiento con funciones en la tumorigénesis por ELISA multiplex (Figura 31B). De las 44 proteínas incluidas en el panel, solo pudimos evaluar el resultado de 27, puesto que en algunas de ellas no se detectó secreción y en otras la secreción era tan elevada que se saturaba la señal detectada.

Observamos un patrón en el cual los fibroblastos que sobre-expresaban IL-11 tenían una mayor secreción de 15 de las 27 proteínas analizadas, en comparación con la misma línea celular con el plásmido vacío. Por el contrario, los fibroblastos con silenciamiento de IL-11 mostraron una menor secreción de 16 de las 27 proteínas analizadas, en comparación con la línea control. Estos cambios de expresión fueron de diferentes rangos de magnitud, de ahí que se representen en 3 gráficas diferentes (Figura 31B).

En cuanto a las proteínas cuya expresión varió con la sobre-expresión o el silenciamiento de IL-11, las clasificamos en función de su papel descrito como pro-tumorales, anti-tumorales y proteínas que, en función del contexto fisiológico en el que se encuentren, podrían tener ambas funciones.

En cuanto a la expresión de proteínas con función pro-tumoral, el efecto más acusado se observó en VEGF-A e IL-6, que aumentaron su secreción de forma significativa en los fibroblastos con sobre-expresión de IL-11 y la disminuyeron en los fibroblastos con silenciamiento de IL-11. RANTES mostró el mismo patrón, aunque el incremento de la expresión fue ligeramente menor. En el caso de FGF2, tanto el silenciamiento de IL-11 como la sobre-expresión disminuyeron su secreción, siendo la disminución más acusada en la línea celular con silenciamiento. Las secreciones de MCP-1 y NGF- β aumentaron tanto al sobre-expresar IL-11 como al silenciarla, pero el aumento era mucho más acusado en la línea con sobre-expresión. Sin embargo, la proteína GRO- α aumentó su secreción considerablemente tras el silenciamiento de IL-11. Además, hay una serie de proteínas pro-tumorales cuya secreción aumentó al sobre-expresar IL-11 y disminuyó al silenciarla, aunque en menor proporción que las anteriores. Estas proteínas fueron BDNF, SCF, eotaxina, LIF, EGF, VEGF-D y HGF. En el mismo rango se encuentra IL-23, cuya expresión aumentó con el silenciamiento de IL-11 (Figura 31B). En cuanto a las proteínas con acción anti-tumoral, la secreción de las citoquinas IL-15 e IL-27 aumentó en la línea

celular con silenciamiento de IL-11 y disminuyó al silenciarla. Sin embargo, el cambio de secreción de IL-2 y MIP-1 α ocurrió al contrario (Figura 31B).

En relación a las proteínas con acción pro y anti-tumoral analizadas, TNF- α , GM-CSF, IL-13, IL-9, IL-4, TNF- β , IL-7 e IL-10, se observó un patrón heterogéneo de cambios de secreción según la expresión de IL-11. A destacar que la secreción de IL-9 e IL-4 aumentó con el silenciamiento de IL-11, y la de IL-7 y TNF- β disminuyó bajo la misma condición (Figura 31B).

En resumen, la sobreexpresión de IL-11 aumentó la secreción de citoquinas y factores de crecimiento con un papel pro-tumoral, mientras que el silenciamiento de IL-11 disminuyó la expresión de los mismos y aumentó la de otras citoquinas con papel anti-tumoral. Este cambio en la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que intervienen en el desarrollo tumoral reforzaría el efecto que IL-11 podría ejercer sobre el microambiente.

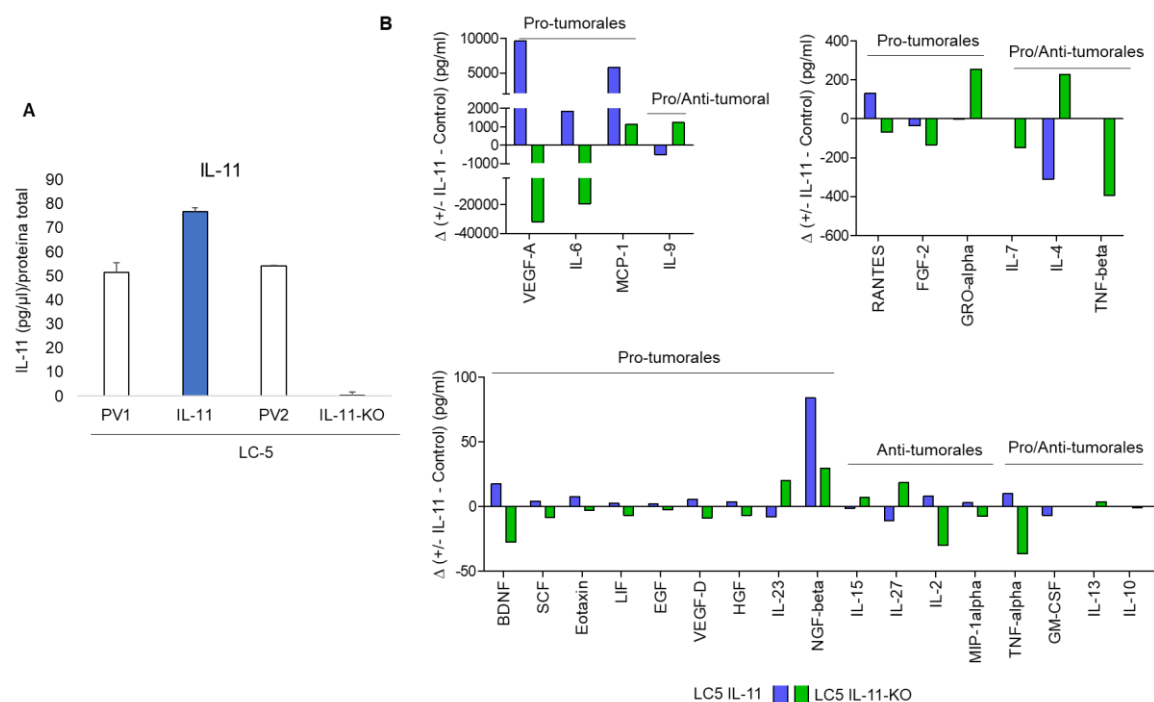


Figura 31. Efecto de IL-11 sobre el secretoma de fibroblastos. Se utilizó la línea celular de fibroblastos LC5 para llevar a cabo un ensayo de ELISA multiplex. Dicha línea celular fue modificada para inducirle la sobre-expresión y el silenciamiento de IL-11, ambos comprobados ELISA (A). Las líneas celulares con sobre-expresión y silenciamiento, además de sus plásmidos vacíos, fueron incubadas durante 48 horas en medio al 5% de suero. El sobrenadante de los cultivos fue analizado por ELISA multiplex y el incremento de la expresión de las citoquinas fue representado en gráficas de barras, tras restar la secreción de las líneas con sobre-expresión o silenciamiento de IL-11 con respecto a la misma línea con expresión del plásmido vacío correspondiente (B). Ensayo realizado por duplicados técnicos. IL-11=línea celular con sobre-expresión de IL-11, IL-11-KO=línea celular con silenciamiento de IL-11.

1.3. Papel de IL-11 en modelos animales de adenocarcinoma de pulmón

Teniendo en cuenta que IL-11 tiene efectos directamente sobre las células tumorales, pero también sobre células del estroma, es importante valorar su papel en modelos que mantienen en mayor medida la complejidad y estructura de los tumores humanos, como los PDX y los originados en ratones genéticamente modificados (GEMMs).

1.3.1. Efecto de la estimulación de IL-11 en modelos PDX

Se analizó el efecto de IL-11 en modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón generados por nuestro grupo a partir de tumores resecados de pacientes con adenocarcinoma de pulmón localizado (estadios I-III).

Se caracterizó una colección de 13 modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón con diferentes alteraciones genómicas para determinar la expresión de IL-11 y de sus subunidades receptoras tanto a nivel de ARNm como de proteína (Figura 32). Se observó que, como en el caso de las líneas celulares, pocos modelos PDX expresaron IL-11 (Figura 32A) y los que secretaron mayores cantidades de IL-11 fueron el 57 y el 80 (Figura 32B). En cuanto a las subunidades receptoras, casi todos expresaron GP130 e IL-11RA (Figura 31C-D), encontrando alta expresión de GP130 a nivel de proteína en los modelos 70, 91, 118 y 134, mientras que los modelos 60, 70, 80, 126 y 134 expresaron mayores niveles de IL-11RA (Figura 32E). Además, se analizó la activación de las proteínas STAT1 y STAT3, observándose una marcada activación basal de STAT1 en los modelos 40, 79 y 34, y de STAT3 en los modelos 70, 80, 118 y 134 (Figura 32E).

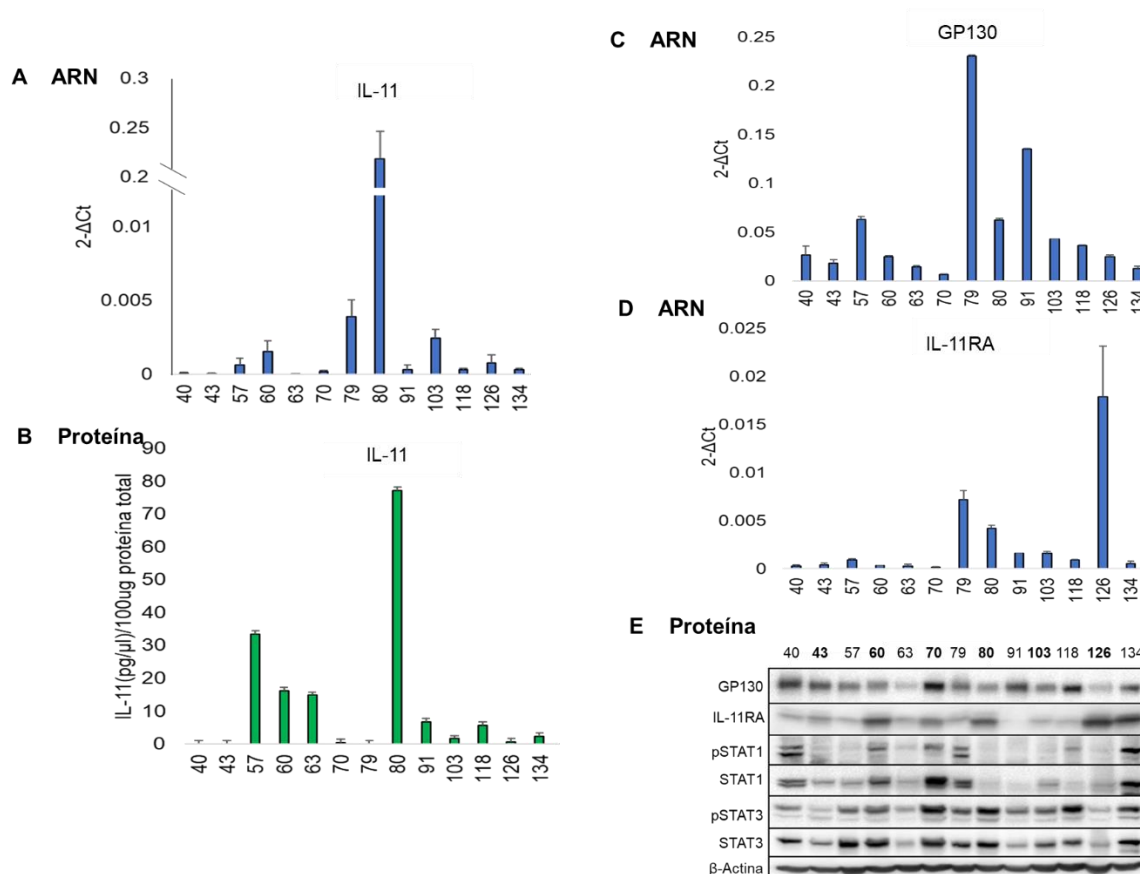


Figura 32. Caracterización de una colección de modelos PDX para la expresión de las proteínas IL-11, GP130, IL-11RA y la activación de STAT1, STAT3. Para cuantificar la expresión de ARNm se realizaron RT-pPCRs para IL-11 (A) y las subunidades receptoras GP130 e IL-11RA (C-D). A nivel de proteína, la secreción de IL-11 se analizó por ELISA (B) y la expresión de las subunidades receptoras, así como la activación de las proteínas STAT1, STAT3, por WB (E). La media y la desviación estándar representadas en el ELISA fueron obtenidas de duplicados técnicos.

A partir de la caracterización anterior pudimos seleccionar los modelos más adecuados para estudiar el efecto de IL-11 en este contexto. Así, para la estimulación *in vivo* con rhIL-11, se seleccionaron los modelos PDX 43 y 126, que no secretaban IL-11 pero sí expresaban el receptor, y no tenían una activación basal elevada de las proteínas STAT1 y STAT3. Estos modelos se caracterizaron histológicamente mediante tinciones de hematoxilina-eosina y se confirmó que mantenían la histología de adenocarcinoma del paciente original. Además, hicimos tinciones con sonda ALU, que tiñe solo las células humanas y nos permitió detectar y cuantificar el porcentaje del componente estromal murino de cada tumor, encontrando aproximadamente un 20% en el modelo PDX43 y un 40% en el PDX126 (Figura 33A).

Para realizar los experimentos de estimulación con rhIL-11 en los modelos seleccionados, partimos de tumores crecidos en un ratón por modelo, que se extrajeron para implantar subcutáneamente fragmentos en 12 ratones atímicos en ambos flancos.

Cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 150-200mm³ los animales se repartieron en 2 grupos de 5 animales, uno al que se le administró intraperitonealmente rhIL-11 (500 µg/kg) y otro al que se le administró solo el vehículo. Se administraron 3 dosis por semana, durante 3 semanas (Figura 33B). El tamaño de los tumores fue medido con calibre de precisión cada 5 días y el último día de tratamiento se sacrificaron los ratones y se extrajeron y procesaron los tumores. Se comprobó que, al representar su crecimiento en el tiempo, normalizando por el tamaño de cada tumor al inicio de tratamiento, la estimulación con IL-11 incrementó ligeramente el crecimiento tumoral en ambos modelos PDX, especialmente en el PDX43 cuya diferencia resultó estadísticamente significativa (Figura 33C-D). Se analizó la expresión de pSTAT3, Ki67 y Ciclina D1 mediante tinción IHQ (Figura 34E-F) y en el modelo PDX 43 no encontramos diferencias en la activación de las proteínas STAT ni en la expresión de Ki67, pero sí en la expresión de Ciclina D1 en los tumores con estimulación por rhIL-11 (Figura 33E). En el modelo 126, se observó un aumento de la fosforilación de STAT3 en los tumores con estimulación con rhIL-11, además de un aumento en la expresión de Ciclina D1 y Ki67 (Figura 33F). El aumento de la proliferación se produjo solo en las células tumorales y no en el componente estromal, tal y como se aprecia en las tinciones con Ciclina D1 y Ki67 (Figura 33E-F).

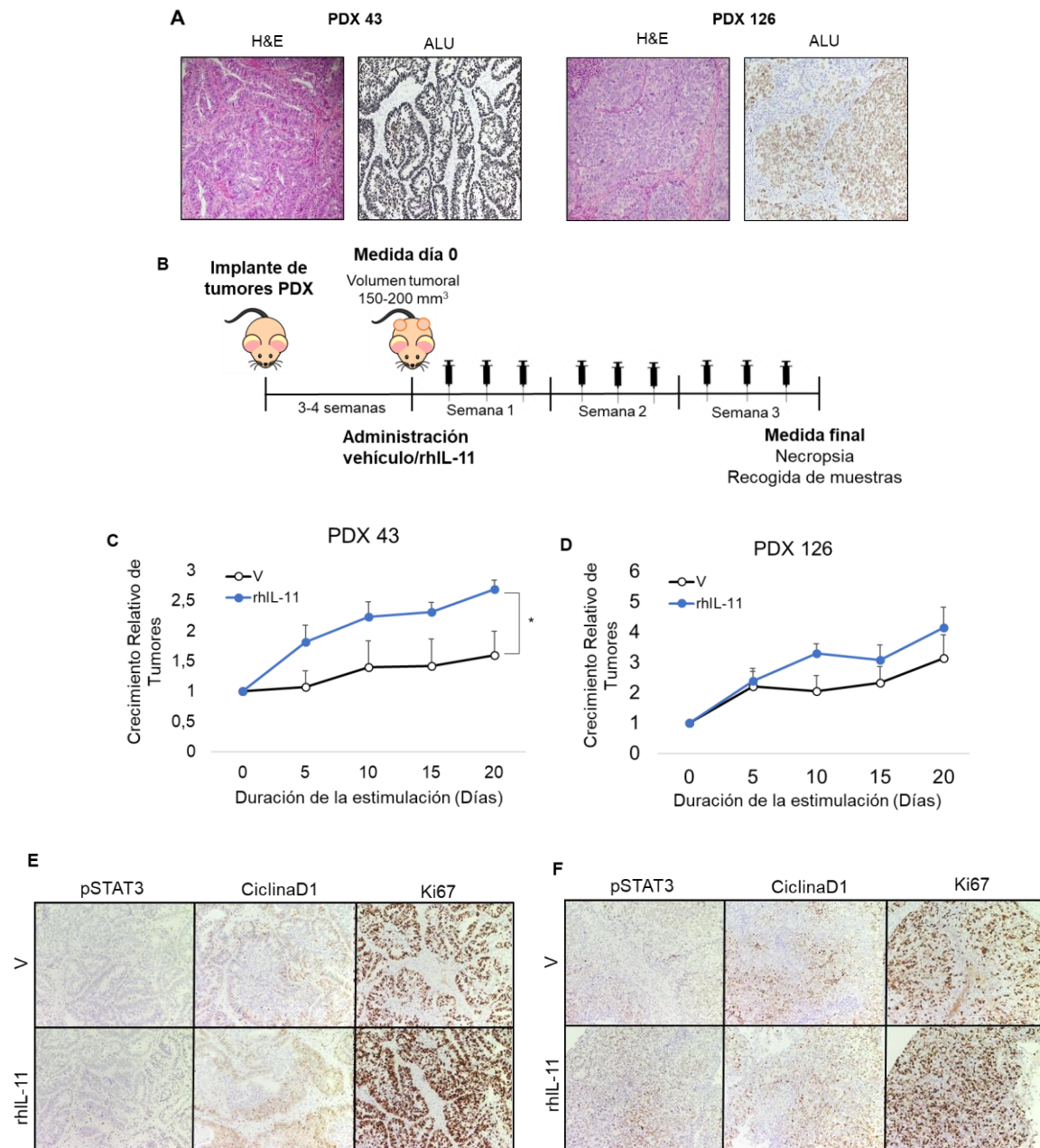


Figura 33. Efecto de IL-11 en el crecimiento de tumores en modelos PDX. Los modelos PDX 43 y 126 fueron caracterizados histológicamente mediante tinción con hematoxilina-eosina y la hibridación con la sonda ALU (A). Se implantaron los tumores PDX 43 y 126 en ambos flancos de ratones atímicos y cuando alcanzaron un tamaño de 150-200 mm³ fueron estimulados con rhIL-11 o con vehículo mediante inyección intraperitoneal, 3 veces por semana (B). El crecimiento relativo de los tumores 43 (C) y 126 (D) se calculó normalizando el tamaño tumoral a lo largo del procedimiento con respecto al que tenían en el día de inicio del tratamiento. N= 5, siendo N el número de animales incluido en cada grupo. Se analizó por tinciones de IHQ, la expresión de las proteínas pSTAT3, Ki67 y Ciclina D1 de los modelos PDX43 (E) y PDX126 (F). En las IHQ se representan imágenes representativas de un animal de cada grupo. El análisis estadístico realizado fue el test U-Mann Whitney. *(p<0.05). H&E=hematoxilina-eosina, V=animales tratados con vehículo, rhIL-11=animales con administración de rhIL-11, PDX=*patient derived xenograft*.

1.3.2. Efecto de la estimulación de IL-11 en modelos genéticamente modificados

Se utilizó el modelo animal inducible de adenocarcinoma de pulmón *KRAS^{LSLG12Vgeo};P53^{LoxP}*, generado y cedido por el grupo del Dr. Mariano Barbacid, para estimularlo con rhIL-11 y estudiar el efecto que podría tener en la progresión de tumores. Para inducir el desarrollo de los tumores, se administraron partículas virales adenocrea a 15 animales por vía intranasal. Una vez se confirmó la aparición temprana de los tumores por micro-CT (3-5 mm³) los animales se repartieron en 2 grupos, un grupo con administración intraperitoneal de rhIL-11 (500 µg/kg) y otro con administración de vehículo, 3 veces por semana, durante 4 semanas (Figura 34A). Al finalizar el tratamiento, se recogieron lavados broncoalveolares, muestras de los tumores y los pulmones. Para comprobar que la distribución de la rhIL-11 había llegado al pulmón, se analizó mediante ELISA el lavado broncoalveolar de 2 animales con administración de rhIL-11 y 2 con administración de vehículo, encontrando una alta cantidad de IL-11 en los animales en los que se administró la citoquina en comparación con los que tuvieron administración de vehículo (Figura 34B). El tamaño final de los tumores se relativizó al inicial, medido el primer día de administración de rhIL-11 (Figura 34C). Además, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina de los pulmones y los tumores de los animales incluidos en los dos grupos y se incluyeron animales control, sin tumores (Figura 34E). En los animales estimulados con rhIL-11 se observó un ligero aumento del tamaño de los tumores y un incremento en el número de tumores totales al finalizar el procedimiento, tanto por microCT (Figura 34C-D) como en las tinciones de hematoxilina-eosina (Figura 34E).

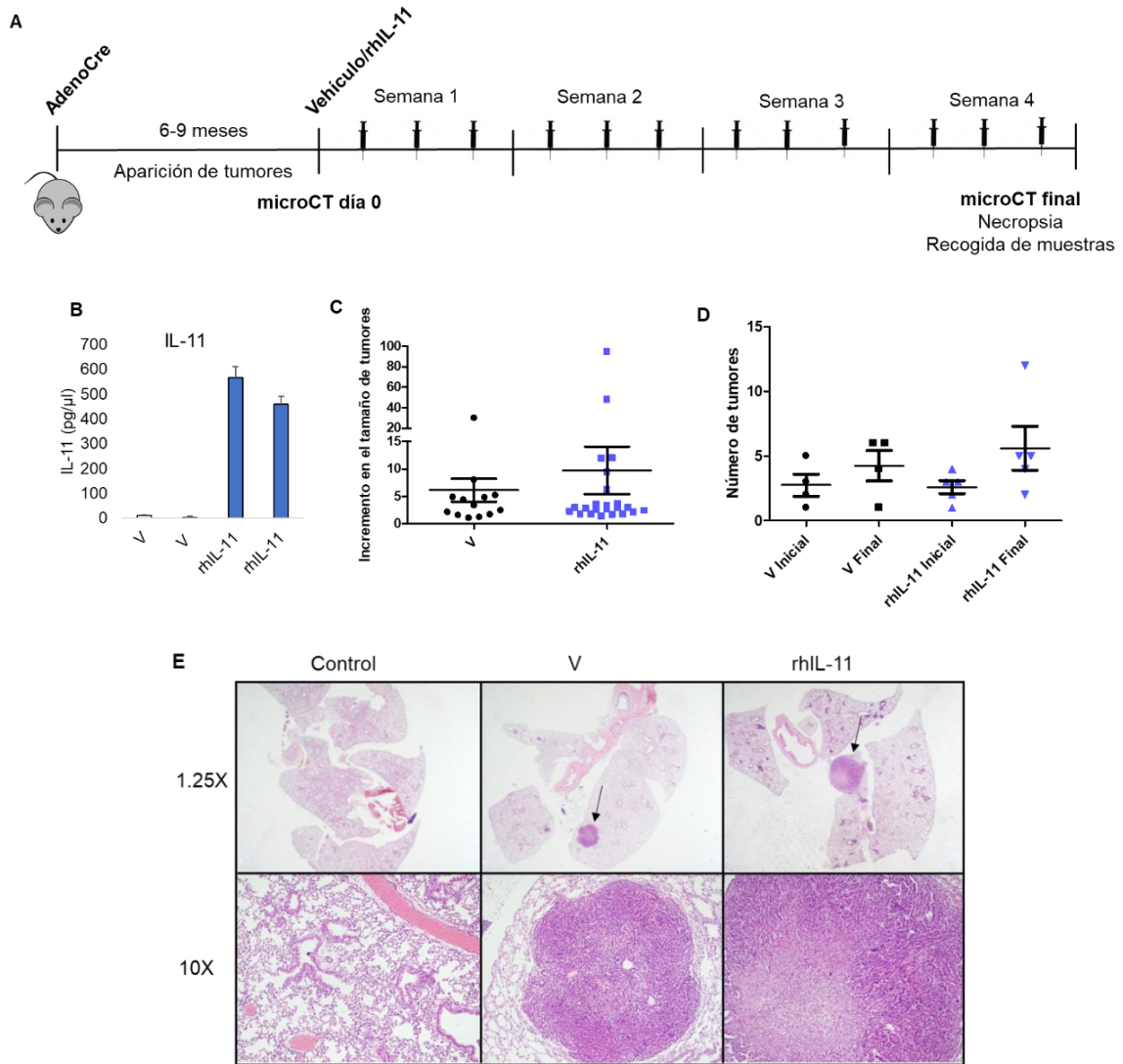


Figura 34. Efecto de IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón inducido por la mutación de *KRAS* y el silenciamiento de *TP53* en modelos animales. La formación de adenocarcinomas se indujo por administración de virus adenocre por vía intranasal. Los animales desarrollaron tumores a los 6-9 meses. Se realizó un microCT inicial, para obtener el tamaño de los tumores en el día 0, y se repartieron los animales en 2 grupos de 5 ratones para la administración de rhIL-11 o vehículo (N=5). Se administraron 3 dosis por vía intraperitoneal a la semana, durante 4 semanas (A). Para comprobar que la IL-11 llegaba al pulmón, se recogió lavado broncoalveolar a 4 animales, 2 con administración de vehículo y 2 con administración de rhIL-11 y se analizó la concentración de IL-11 por ELISA (B). El tamaño de los tumores al final del procedimiento se relativizó al inicial y se representó el incremento relativo en el tamaño de los tumores (C). Se representó el número de tumores al inicio y al final del procedimiento en animales con administración rhIL-11 o vehículo medidos por microCT (D). Tinción de hematoxilina-eosina de los pulmones de animales sin tumores, con tumores y administración de vehículo, y con tumores y estimulación con rhIL-11 (E). V=animales con administración de vehículo, rhIL-11=animales con administración de rhIL-11.

2. PAPEL DE IL-11 COMO BIOMARCADOR PRONÓSTICO

Para comprobar si IL-11 e IL-11RA presentaban un papel pronóstico, concordante con el papel oncogénico que parece tener en el adenocarcinoma de pulmón según nuestros resultados anteriores, se analizó una cohorte propia de pacientes con adenocarcinoma de pulmón resecados del Hospital Universitario 12 de Octubre. Contábamos con muestras parafinadas para analizar la expresión de proteína mediante IHQ en 119 pacientes (Figura 35A-F) de los cuales, de 67 de los casos contábamos con muestras congeladas en las que pudimos analizar la expresión génica por RT-1PCR (Figura 35G-J). De todos los pacientes se recogió la información clínica y de evolución para los análisis posteriores.

A nivel de proteína, las muestras de paciente se dividieron en 2 grupos: con tinción positiva, considerado como grupo con alta expresión de IL-11, y tinción negativa, con expresión nula o indetectable de IL-11, considerado grupo con baja expresión de IL-11. Dentro del grupo de tinción positiva, incluimos las muestras con tinción débil, moderada y fuerte. De los 119 pacientes de la cohorte pudieron valorarse 110 muestras para IHQ, de las cuales 17 presentaron tinción positiva para IL-11 en células tumorales y 21 en células del estroma, incluyendo a 4 casos con tinción positiva tanto en células tumorales como del estroma. En el caso de IL-11RA, 26 muestras fueron consideradas como positivas.

En relación al análisis de supervivencia, observamos que niveles elevados de IL-11 correlacionaban con una menor supervivencia global (Figura 33A) y una menor supervivencia libre de progresión (Figura 35D) (cocientes de riesgo 2.11[1.224-3.662] y 1.82[0.981-3.347] respectivamente). En el caso de IL-11RA, no se observaron diferencias significativas en supervivencia global (cociente de riesgo 1[0.558-1.805]) (Figura 35B), aunque la supervivencia libre de progresión mostró una tendencia de reducirse cuando el nivel de IL-11RA era más elevado (cociente de riesgo 1.71[0.878-3.322]) (Figura 35E). Al comparar pacientes con baja o alta expresión de ambos genes a la vez, se detectó que pacientes con alta expresión de IL-11 e IL-11RA correlacionaban con una peor supervivencia global (Figura 35C) y libre de progresión (Figura 35F), aunque la diferencia en supervivencia global no era estadísticamente significativa influido quizás por el bajo número de pacientes analizados en este subgrupo (N=27) (cocientes de riesgo 2.80[1.210-6.504] y 1.2[0.418-3.466] respectivamente).

A nivel de ARN, observamos que niveles altos de IL-11 correlacionaron con una disminución no significativa de la supervivencia global (cociente de riesgo 1.66[0.904-3.039] (Figura 35G) y de la supervivencia libre de progresión (cociente de riesgo 1.86[0.587-4.038] (Figura 35I). En el caso de IL-11RA, no se observaron diferencias

significativas en supervivencia global (Figura 35H) ni libre de progresión (Figura 35J), (cocientes de riesgo de 1.18[0.981-3.347] y de 1.56[0.536-4.483] respectivamente). Estas diferencias estadísticamente no significativas podrían deberse a que el número de pacientes incluidos en el análisis a nivel de ARN era menor que en los mismos análisis a nivel de proteína. No se pudo realizar la comparación de pacientes con baja o alta expresión de ambos genes a la vez, puesto que el número de pacientes con alta expresión de IL-11 e IL-11RA era muy reducido (N=3).

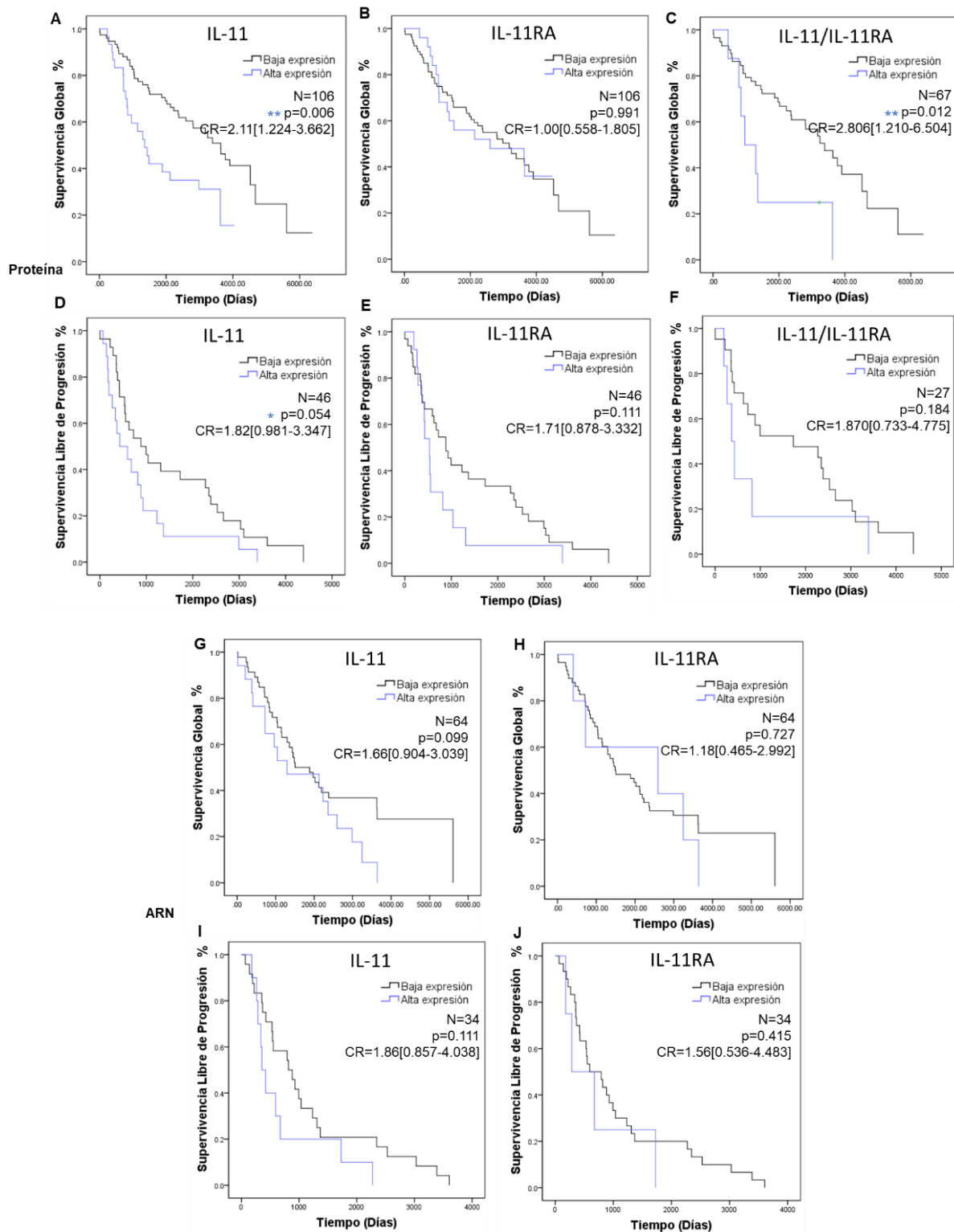


Figura 35. Asociación de la expresión proteínica y ARNm de IL-11 y de IL-11RA con la supervivencia en una cohorte propia de pacientes con adenocarcinoma del Hospital Doce de Octubre. Datos de supervivencia global (A-C) y libre de progresión (D-F) en relación con la expresión proteica de IL-11 e IL-11RA y la combinación de IL-11 e IL-11RA. Funciones de supervivencia global (G-H) y libre de progresión (I-J) en relación a la expresión de ARNm de IL-11, IL-11RA. El criterio utilizado para calificar como baja y alta expresión de proteína fue que la tinción IHQ fuera positiva o negativa, y el valor del tercer cuartil de la mediana en la expresión de ARN. El análisis de supervivencia y el p valor se obtuvieron mediante el test de Kaplan-Meier y el cociente riesgo se obtuvo por la regresión de Cox. N=número de pacientes, CR=cociente de riesgo. *(p<0.05) **(p<0.01).

Para confirmar los resultados obtenidos con nuestra cohorte, se utilizó la cohorte pública más amplia *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Se obtuvieron los datos de expresión de ARNm de IL-11 e IL-11RA y se correlacionaron con la información clínica de los pacientes (N=522) (Figura 36), clasificándolos como pacientes con alta o baja expresión génica, tomando como criterio el tercer cuartil de la mediana. Pacientes con expresión alta de IL-11 correlacionaron con una disminución estadísticamente significativa de supervivencia global (cociente de riesgo de 1.59[1.087-2.334]) (Figura 36A) y con una disminución, aunque no estadísticamente significativa de la supervivencia libre de progresión (cociente de riesgo de 1.47[0.950-2.262]) (Figura 36D). En el caso de IL-11RA, pacientes con alta expresión correlacionaron también con una menor supervivencia global (cociente de riesgo de 1.19[0.752-1.900]) (Figura 36B) y libre de progresión (cociente de riesgo de 1.15[0.681-1.943]) (Figura 36D), aunque sin alcanzar la significancia estadística. Al comparar pacientes con baja o alta expresión de ambos genes a la vez, la influencia en la supervivencia fue más acusada tanto en supervivencia global (cociente de riesgo de 2.89[1.311-6.369]) (Figura 36C) como libre de progresión (3.01[1.074-8.493]) (Figura 36F) y fue estadísticamente significativa en ambos casos.

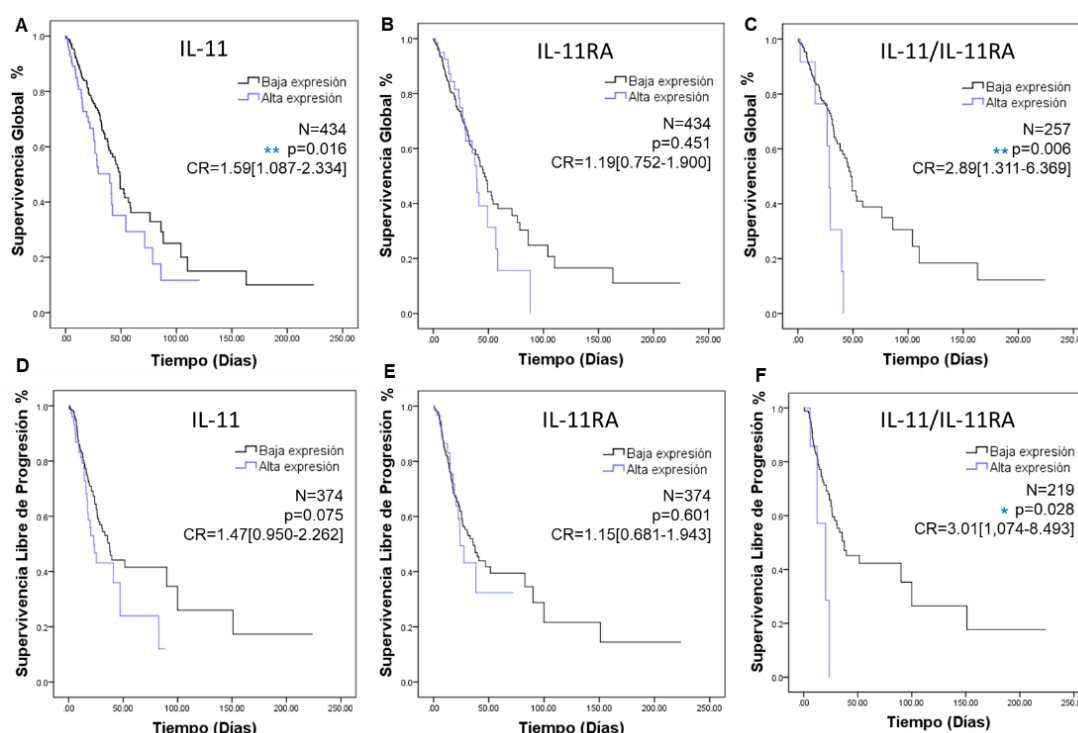


Figura 36. Asociación de la expresión de ARNm de IL-11 y de IL-11RA con la supervivencia en la cohorte de pacientes con adenocarcinoma de la TCGA. Funciones de supervivencia según la expresión alta o baja de IL-11 y de IL-11RA, y de pacientes con expresión baja o alta de ambas proteínas. Supervivencia global (A-C). Supervivencia libre de progresión (D-F). El criterio utilizado para calificar como baja y alta expresión fue el valor del tercer cuartil de la mediana. El análisis de supervivencia y el p valor se obtuvieron mediante el test de Kaplan-Meier y el cociente riesgo se obtuvo por la regresión de Cox. N=número de pacientes, CR=cociente de riesgo. *(p<0.05) **(p<0.01).

Estos resultados sugieren que IL-11 podría actuar como biomarcador pronóstico en pacientes con adenocarcinoma de pulmón y concuerda con el efecto oncogénico encontrado en nuestros estudios previos.

3. PAPEL DE IL-11 COMO DIANA TERAPÉUTICA

Los resultados previos, especialmente los observados por el silenciamiento de IL-11, sugieren que la vía de la IL-11 podría ser una potencial diana terapéutica y tendría sentido generar una herramienta farmacológica que pudiera ser eficaz para reducir el crecimiento de los tumores de adenocarcinoma de pulmón que presenten altos niveles de expresión de IL-11. Para ello, en colaboración con la unidad de anticuerpos monoclonales del CNIO y la unidad de cristalografía e ingeniería de proteínas, hemos generado y purificado un anticuerpo neutralizante contra IL-11RA. Validamos el anticuerpo anti-IL-11RA producido para WB al comprobar que detectaba IL-11RA en la línea celular que lo sobre-expresaba (Figura 37A). Posteriormente, comprobamos su efecto neutralizante en la vía JAK/STAT *in vitro*, tanto en líneas celulares en crecimiento 2D (Figura 37B), como en organoides (3D) (Figura 37C). Para ello, tratamos tanto las células como los organoides durante 24 horas con el anticuerpo para luego estimularlos con rhIL-11 durante 15 minutos y analizar después la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 (Figura 37B-C). En las líneas celulares y los organoides tratados con el anticuerpo se inhibió la fosforilación de STAT1 y STAT3 producida por IL-11, lo que confirmaba su efecto bloqueante de la vía *in vitro*.

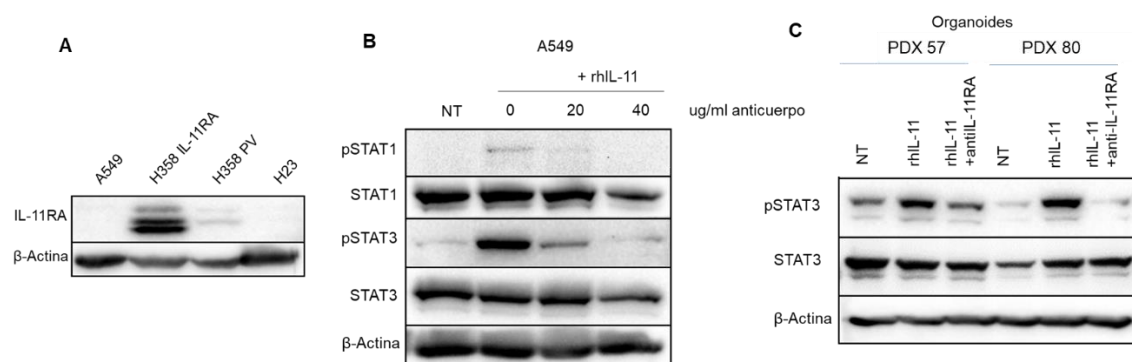


Figura 37. Caracterización del anticuerpo neutralizante de IL-11RA. El anticuerpo neutralizante de IL-11RA producido se validó para la detección por WB en las líneas celulares A549 y H23, y en H358 con sobre-expresión de IL-11RA o con expresión del plásmido vacío (A). Para comprobar su efecto neutralizante, se estimularon las células A549 (B) y los organoides provenientes de los PDX 57 y 80 (C) con rhIL-11, previamente tratados con el anticuerpo neutralizante. Posteriormente se realizaron extractos proteicos y se analizó por WB la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 (C). H358 IL-11RA=línea H358 con sobre-expresión de IL-11RA, H358 PV=línea H358 con expresión de plásmido vacío, NT=no tratado, rhIL-11=proteína recombinante IL-11.

Tras comprobar que el anticuerpo tenía efecto neutralizante *in vitro*, se eligió al modelo PDX57, que expresaba IL-11 y su receptor, pero no tenía una activación basal elevada de la vía JAK/STAT, para realizar el tratamiento *in vivo* (Figura 38). El modelo utilizado mantenía la histología de adenocarcinoma de origen, como confirmó la tinción con hematoxilina-eosina (Figura 38A), y contaba con un porcentaje de estroma murino del 40% aproximadamente.

Para realizar los tratamientos en el modelo seleccionado, partimos de un ratón con tumores crecidos que se extrajeron para implantar subcutáneamente fragmentos en ambos flancos de 18 ratones atímicos. Cuando estos tumores alcanzaron un volumen de 200mm³ los animales se repartieron en 3 grupos de 5 animales: un grupo control, al que se administró solo vehículo, un grupo tratado con anti-IL-11RA (300 µg/ratón) y un tercer grupo tratado con anticuerpo anti-GST (glutación-S-transferasa) (300 µg/ratón), como control de especificidad. El tratamiento se hizo vía intraperitoneal y se administraron 3 dosis semanales durante 3 semanas (Figura 38B). Los tumores se midieron cada 5 días con calibre de precisión y el tamaño de cada tumor se normalizó con el que tenía el día que comenzó el tratamiento. Como resultado del tratamiento, se observó que el anticuerpo neutralizante de IL-11RA disminuyó de forma significativa el tamaño de los tumores (Figura 38C). Las tinciones de IHQ mostraron que el tratamiento con el anticuerpo neutralizante contra IL-11RA reducía la activación de la proteína STAT3 y la expresión de las proteínas de proliferación de Ciclina D1 y Ki67 (Figura 38D).

Este resultado confirma que la inhibición de la vía de IL-11 podría ser una adecuada estrategia terapéutica para los tumores de adenocarcinoma de pulmón con altos niveles de esta proteína.

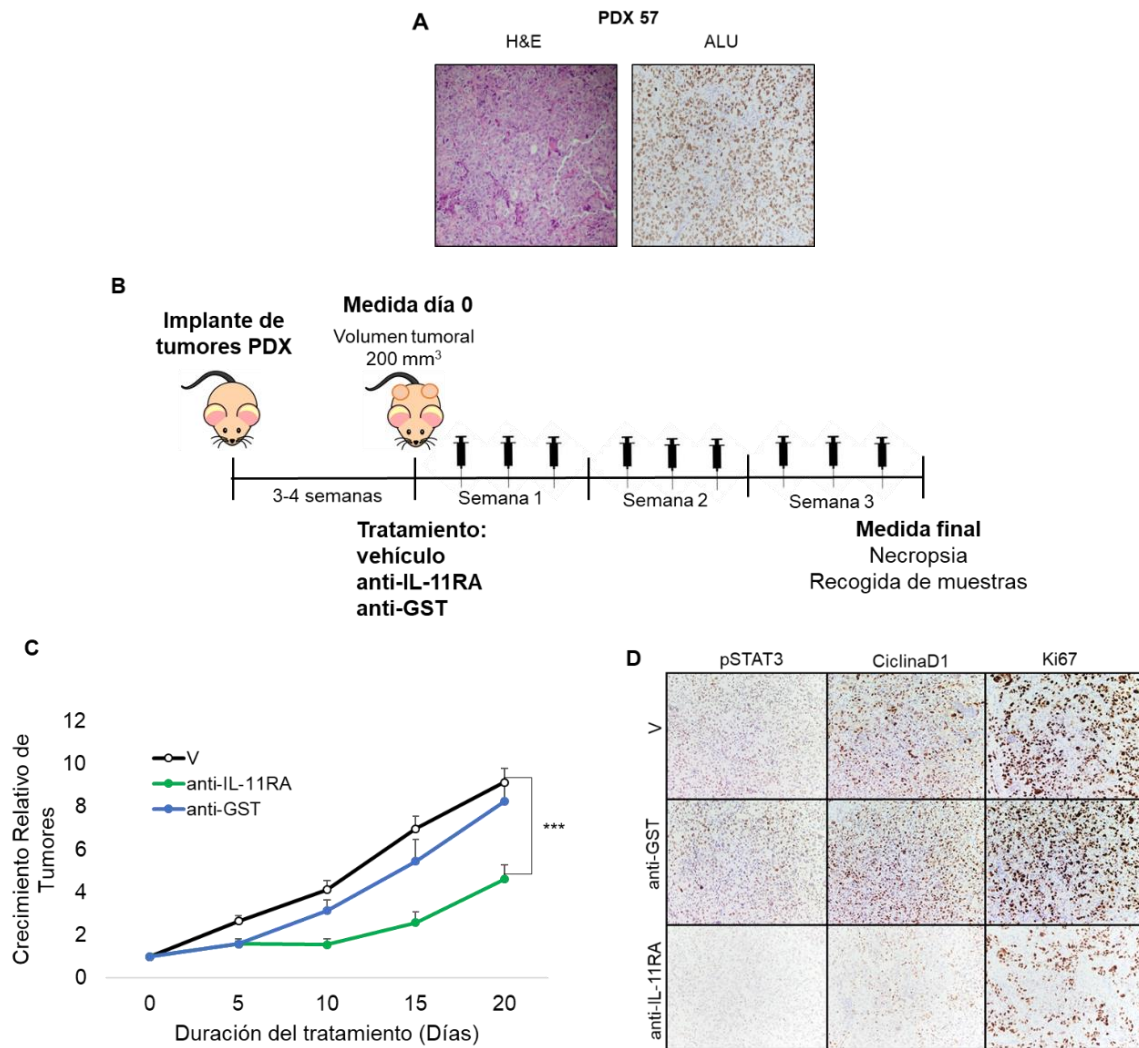


Figura 38. Efecto del anticuerpo neutralizante de IL-11RA *in vivo*. El modelo PDX 57 fue caracterizado histológicamente mediante tinción con hematoxilina-eosina y la hibridación con la sonda ALU (A). Se implantó el tumor PDX 57 en ambos flancos de ratones atímicos y cuando alcanzaron un tamaño de 200 mm³ fueron tratados con anti-IL-11RA, anti-GST y con vehículo, intraperitonealmente, 3 veces por semana, durante 3 semanas. Se incluyeron 5 ratones por grupo (N=5) (B). El crecimiento relativo de los tumores se calculó normalizando el tamaño tumoral a lo largo del procedimiento con respecto al que tenían en el día de inicio del tratamiento (día 0) (C). Se analizó por tinciones de IHQ la expresión de las proteínas PSTAT3, Ki67 y Ciclina D1 (D). El análisis estadístico realizado fue el test Kruskal-Wallis. ***($p < 0.01$). Se realizaron tinciones de los tumores de 3 animales de cada grupo y se representó una tinción representativa de cada uno. H&E=hematoxilina-eosina, V=animales tratados con vehículo, anti-GST=animales tratados con anti-GST, anti-IL-11RA=animales tratados con anticuerpo neutralizante de IL-11RA, PDX=*patient derived xenograft*.

DISCUSIÓN

A lo largo de este trabajo se aportan evidencias, *in vitro* e *in vivo* a favor del papel pro-tumorigénico de IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón. El efecto pro-oncogénico en tumores humanos resulta en un peor pronóstico para los pacientes afectados de adenocarcinoma con alta expresión de IL-11, y refrendaría su potencial papel como diana terapéutica. En este estudio se aportan datos iniciales de la inhibición farmacológica de la vía de IL-11 con un anticuerpo neutralizante de IL-11RA en modelos PDX de adenocarcinoma.

Previo al análisis del efecto de la IL-11 en la fisiología de la célula tumoral, caracterizamos las vías de señalización activadas por IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón. Encontramos que la estimulación exógena con IL-11 inducía una pronunciada activación de la vía JAK/STAT en todas las líneas estudiadas, mientras que sólo aumentaba ligeramente la activación de las vías RAS/ERK y PI3K/AKT en algunas líneas. Posteriormente, merced a la sobre-expresión de IL-11RA confirmamos que efectivamente STAT1 y STAT3 eran las proteínas que experimentaban un mayor aumento en su fosforilación tras la estimulación con IL-11. Estos datos concuerdan con lo descrito por otros autores que han relacionado las propiedades pro-oncogénicas de IL-11 con la activación, sobre todo, de la proteína STAT3 en tumores colorectales [35], gástricos [112], de endometrio [146][159] y de mama [158]. En el caso del cáncer no microcítico de pulmón, se ha descrito recientemente la activación de STAT3 y de AKT por IL-11 en líneas celulares [194], aunque en el presente trabajo la activación de AKT sólo se observó en algunas líneas y fue de modo más tenue que la activación observada de las proteínas STAT1 y STAT3.

Para estudiar el papel directo que IL-11 podría ejercer sobre las células tumorales, realizamos diferentes ensayos subrogados de tumorigenicidad. En primer lugar, modificamos líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón para que sobre-expresaran IL-11RA y las estimulamos exógenamente con IL-11, lo que produjo un aumento leve en algunas de las propiedades tumorales estudiadas como la proliferación al 5% y la capacidad de formar colonias a baja densidad. Al caracterizar la duración de la activación de las vías de señalización, comprobamos que las proteínas STAT1 y STAT3 alcanzaban un máximo de activación 15 minutos tras la estimulación, pero disminuía a partir de ese momento, siendo indetectable una hora después. De esta forma, concluimos que probablemente la activación de vías de señalización producida por la IL-11 añadida exógenamente era tan corta que no era suficiente para traducirse en modificaciones fisiológicas muy acusadas en las líneas celulares. Estos resultados coinciden con los obtenidos para carcinoma endometrial, en los que la estimulación exógena con IL-11 no tuvo efectos ni en la viabilidad de células ni en la proliferación [111], aunque difieren de

los publicados para cáncer de próstata [192] y de mama [158], en los que la adición de IL-11 exógena a cultivos celulares si aumentó claramente sus propiedades tumorales. Cabe resaltar que la discordancia de efectos observada en los diferentes tipos tumorales no es atribuible a las condiciones experimentales, incluidas las concentraciones de IL-11 añadidas y el tiempo de exposición.

Tras esta imposibilidad de mantener la activación de las rutas STAT1/3 por adicción exógena de IL-11, decidimos sobre-expresar IL-11 en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón y realizar ensayos subrogados para medir su efecto en diferentes propiedades tumorales. En este caso, observamos un aumento leve de la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT3, que se correspondía con un aumento de algunas propiedades tumorales, como la capacidad de proliferación y la de formar colonias. Sin embargo, este efecto fue leve, lo cual nos llevó a especular que la sobre-expresión de IL-11 en ausencia de sobre-expression del receptor podría saturar fácilmente el receptor endógeno impidiendo ver un efecto de mayor magnitud. Otros autores, sin embargo, utilizando otras líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón, sí observaron efectos más marcados en la tumorigénesis al sobre-expresar IL-11 [194]. Siguiendo nuestra línea argumental, esto podría deberse a que las líneas utilizadas expresaban niveles endógenos de GP130 mayores que las líneas que utilizamos en el presente proyecto.

En vista de la aparente necesidad de expresar concurrentemente IL-11 y su receptor específico para conseguir activaciones más prolongadas y efectos más marcados, como tercera estrategia, realizamos co-transfecciones con el fin de sobre-expresar IL-11 en las mismas células que ya tenían sobre-expresado IL-11RA endógena o exógenamente. Sin embargo, no fue posible co-sobre-expresar ambas proteínas a la vez en ninguna de las cuatro líneas celulares utilizadas, interpretando que esto podría deberse a mecanismos de regulación intrínsecos de las células que impiden la sobre-expresión de ambas proteínas concurrentemente.

Finalmente, ante la imposibilidad de co-expresar ambas proteínas en la misma línea celular, realizamos ensayos subrogados en co-cultivos indirectos con células que sobre-expresaban IL-11RA con la misma línea celular sobre-expresando IL-11. Sin embargo, aunque comprobamos que la IL-11 secretada por las células del co-cultivo indirecto llegaba al medio de las células con sobre-expresión de IL-11RA, lo hacía en baja cantidad (menor que la observada en los cultivos de células con sobreexpresión de IL-11) y no era suficiente para activar las vías de las proteínas STAT1 y STAT3, y por tanto tampoco se traducía en un efecto fisiológico sobre las propiedades tumorales analizadas. Este mismo experimento de co-expresión fue realizado *in vivo* co-inyectando las células en ratones

atímicos. En este caso, las células con sobre-expresión de IL-11 dieron lugar a tumores de mayor tamaño que los producidos por células con expresión de plásmido vacío o con sobre-expresión de IL-11RA, pero la co-inyección de células con sobre-expresión de IL-11 e IL-11RA fue la condición que generó tumores de mayor tamaño de modo significativo. Esto indicaba que, por un lado, la activación de las células con sobre-expresión de IL-11RA por las células con sobre-expresión de IL-11 era posible *in vivo* y producía un efecto pro-tumorigénico sobre los tumores. Además, este marcado efecto *in vivo* y no *in vitro* revelaba la posibilidad de que IL-11 pudiera actuar también sobre el microambiente tumoral, favoreciendo así la progresión tumoral.

Para complementar la evaluación del efecto de la IL-11 sobre las células tumorales, silenciemos su expresión en líneas de adenocarcinoma de pulmón, analizamos la activación de la ruta JAK/STAT y realizamos diferentes ensayos subrogados para medir su impacto en algunas propiedades tumorales. Así, observamos que el silenciamiento de IL-11 producía una clara pérdida de activación de las proteínas STAT1 y STAT3 en comparación con la línea celular con expresión del plásmido vacío. Además, observamos una disminución de las proteínas p21, ciclina D1 y BCL2, cuyos genes han sido descritos como dianas de las proteínas STAT1 [195] y STAT3 [196][197][198]. Esta inhibición de la ruta JAK/STAT producida por el silenciamiento de IL-11 se traducía en una reducción muy significativa de todas las propiedades oncogénicas estudiadas, tanto la proliferación al 5% y al 0% de SFB, como la formación de colonias en baja densidad y con independencia de anclaje, y la migración. Con estas líneas celulares silenciadas también generamos *xenografts* y observamos una disminución muy significativa del crecimiento de tumores cuando inyectamos líneas celulares con silenciamiento de IL-11 frente a los procedentes de la misma línea celular con expresión del plásmido vacío. Nuestros datos coinciden con los descritos por otros autores que también han estudiado el efecto de IL-11 en el cáncer no microcítico de pulmón, ya que observaron que la disminución de la expresión de IL-11 con shRNAs en líneas de adenocarcinoma reducía significativamente la tumorigénesis *in vitro* e *in vivo* [194]. En este estudio IL-11 favorecía la proliferación tumoral, la migración e invasión y la adquisición de un fenotipo mesenquimal.

Tras observar los pronunciados efectos del silenciamiento de IL-11, nos preguntamos si se reproducirían al silenciar su receptor específico IL-11RA, pues nos ayudaría a comprender el resultado biológico y ampliaría potencialmente las dianas para intervención terapéutica. Efectivamente, confirmamos que el silenciamiento de IL-11RA daba lugar a una disminución muy significativa de las propiedades tumorales estudiadas tanto *in vitro* como *in vivo*. Hasta el momento, no se ha descrito el efecto en la tumorigénesis del silenciamiento de IL-11RA *in vitro*, aunque sí se ha visto que su inhibición con un

anticuerpo neutralizante de IL-11RA redujo la proliferación y la invasión en líneas celulares de carcinoma de endometrio [160].

Estos resultados confirman que IL-11 ejerce un efecto pro-oncogénico directo sobre la célula tumoral en el adenocarcinoma pulmonar ya que, aunque los efectos de la sobreexpresión obtenidos en ensayos *in vitro* fueron limitados (posiblemente por no conseguir una activación suficiente y sostenida), el silenciamiento de la vía de IL-11 dio lugar a una reducción muy significativa de las propiedades tumorales *in vitro* y especialmente *in vivo*.

Nuestros resultados en ensayos *in vivo* hacen pensar que IL-11 podría tener un papel relevante sobre el microambiente tumoral. Hasta ahora el papel de IL-11 en la tumorigénesis ha sido descrito por otros autores en otros tipos de tumores, sin embargo, su efecto sobre el microambiente no ha sido exhaustivamente explorado. Quisimos por tanto analizar el efecto de IL-11 sobre otras células del microambiente, y decidimos analizar el papel de IL-11 sobre los fibroblastos, previamente sugeridos como fuente de IL-11 en el carcinoma colorectal [35] y en el de pulmón [193][42]. Por ARNseq se analizó la expresión de IL-11 en un panel de líneas celulares provenientes de cultivos primarios de fibroblastos de tumores de pacientes (CAFs) y fibroblastos de tejido sano de los mismos individuos. La expresión de IL-11 era más elevada en la mayor parte de los fibroblastos tipo CAF que en los fibroblastos normales, indicando que la secreción de IL-11 podría aumentar en el contexto del tumor. Posteriormente, caracterizamos la expresión de IL-11 a nivel de proteína en las líneas celulares provenientes de fibroblastos y se comprobó que secretaban mayor nivel de IL-11 que las líneas celulares tumorales, confirmando así que los CAFs podrían ser una fuente relevante de IL-11 en el adenocarcinoma de pulmón. Finalmente, mediante ensayos de medios condicionados, describimos que la célula tumoral inducía un aumento de la expresión de IL-11 por parte de los fibroblastos humanos, algo que ya había sido descrito con anterioridad en fibroblastos murinos [42]. En dicho estudio, aislaron CAFs de modelos animales con tumores de adenocarcinoma de pulmón, además de fibroblastos de tejido sano, observando un aumento de la expresión de varias citoquinas y factores de crecimiento en los CAFs, entre las que se encontraba IL-11.

A continuación, y para determinar el efecto fisiológico que IL-11 podría tener sobre los fibroblastos, primero caracterizamos la activación de vías de señalización por parte de esta citoquina. Al estimular exógenamente líneas celulares de fibroblastos con IL-11 observamos un aumento de la activación de las vías JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT, confirmando que los fibroblastos no solo secretan IL-11, sino que también pueden responder a su estímulo. De esta forma, silenciamos IL-11 en fibroblastos y confirmamos

que en ausencia de IL-11 disminuía el crecimiento y la capacidad migratoria. IL-11 por tanto, no solo podría ejercer un efecto pro-oncogénico directo sobre la célula tumoral, sino que también podría influir en la proliferación y migración de los fibroblastos.

Adicionalmente y puesto que los CAFs son células con gran influencia en el microambiente tumoral mediante la secreción citoquinas y factores de crecimiento, estudiamos el efecto que tendría la sobre-expresión y silenciamiento de IL-11 sobre el secretoma de los fibroblastos. Para ello, se sobre-expresó IL-11 en fibroblastos para analizar, en comparación con la misma línea celular expresando el vector vacío, el perfil de secreción de 44 proteínas, e hicimos lo mismo con los fibroblastos con silenciamiento de IL-11. Comprobamos que la sobre-expresión y el silenciamiento de IL-11 daba lugar a cambios importantes en la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, que podrían influir en su efecto fisiológico. Así, los fibroblastos con sobre-expresión de IL-11 mostraron un aumento generalizado de la secreción de citoquinas y factores de crecimiento que, en su mayoría, ejercen efectos pro-tumorales y, por el contrario, el silenciamiento de IL-11 produjo una disminución de la secreción de proteínas con efecto pro-tumoral y un aumento de algunas citoquinas con efecto anti-tumoral. Las proteínas pro-tumorales que presentaban este patrón de cambio de expresión más acusado, con diferencias de más de 100pg/ml, fueron VEGF-A, IL-6 y RANTES (CCL-5), en las cuales la sobre-expresión de IL-11 indujo una mayor secreción y el silenciamiento, por el contrario, la disminuyó. VEGF-A tiene un papel pro-tumoral siendo uno de los factores inductores de angiogénesis más importantes descritos hasta el momento [199]. IL-6 tiene efectos directos en proliferación, invasión y metástasis, además de efectos indirectos sobre el microambiente tumoral también relevantes [118]. Por su parte, RANTES tiene papel pro-tumoral en proliferación, angiogénesis y metástasis, además de favorecer un microambiente inmunosupresor, en diversos tipos de tumores sólidos y hematológicos [200]. La proteína FGF2 experimentó una disminución acusada en los fibroblastos con silenciamiento de IL-11, lo cual concuerda con su papel pro-tumoral. Aunque puede llegar a tener efecto anti-tumoral, su papel pro-tumoral está mejor caracterizado, favoreciendo no solo la proliferación de células tumorales, la angiogénesis y la metástasis, sino también influyendo en células del sistema inmune para, al igual que RANTES e IL-6, favorecer la creación de un ambiente inmunosupresor [200][201]. La quimioquina MCP-1 (CCL-2) también experimentó un aumento importante en su secreción al sobre-expresar IL-11. Su principal función es la de atraer a monocitos, que en el microambiente tumoral se activarán y cambiarán de fenotipo M1 a M2. MCP-1 también puede promover la proliferación, la migración y la angiogénesis [202]. Otras citoquinas, como IL-9, IL-4, TNF- β e IL-7, también mostraron un cambio acusado en su secreción influenciado por IL-11, pero tienen

descritos efectos pro-tumorales o anti-tumorales dependiendo del contexto en el que se encuentren. La sobre-expresión de IL-11 dio lugar a una disminución de la secreción de IL-9 e IL-4 en los fibroblastos, mientras que el silenciamiento de IL-11 aumentó la secreción de ambas interleuquinas. Esto concuerda con el efecto anti-tumoral descrito para IL-4 en tumores de pulmón, donde esta citoquina inhibe la acción pro-tumoral de la IL-1 β [203]. En el caso de la IL-9, está descrita como una citoquina pro-tumoral en tumores hematológicos, aunque en tumores sólidos puede ejercer papel anti-tumoral aumentando la infiltración de células CD8⁺ [204]. Para finalizar las citoquinas TNF- β e IL-7 sufrieron un aumento importante en su secreción en fibroblastos con silenciamiento de IL-11, coincidiendo con sus efectos pro-tumorales descritos en cáncer de pulmón. La relación de TNF- β con cáncer de pulmón ha sido menos estudiada pero se ha descrito que la desregulación de su expresión promueve la tumorigénesis [205]. IL-7, ha sido ampliamente descrita como una citoquina con papel anti-tumoral, que favorece la acción de los linfocitos T DC8⁺ [206], sin embargo, en cáncer de pulmón puede promover la resistencia a la apoptosis [207].

Esta desregulación de la secreción de proteínas pro y anti-tumorales producida por la sobre-expresión y el silenciamiento de IL-11 demuestra que esta citoquina puede jugar un papel muy importante en el desarrollo tumoral mediante su influencia en el microambiente. Este resultado apoya nuestra hipótesis de que IL-11 no solo podría tener efecto directo sobre las células tumorales sino también modificar el microambiente tumoral, modulando la secreción de proteínas que aumentan la inflamación y la angiogénesis, e influyen en las células del sistema inmune para favorecer la inmunosupresión y disminuir la citotoxicidad. En general, otros miembros de la familia de la IL-6, como la propia IL-6 [140][141] y LIF [144], han mostrado un marcado efecto inmunosupresor en este contexto, favoreciendo la evasión inmune del tumor y dificultando la respuesta a inhibidores de PD-1. De modo complementario, sería preciso analizar la capacidad de expresión de IL-11 por parte de otras células del microambiente (MDSC, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales y diferentes poblaciones linfocitarias) y particularmente el impacto de IL-11 en la conformación del paisaje inmune del tumor.

Una vez caracterizado el papel de IL-11 sobre las células tumorales y, al menos parcialmente sobre el microambiente, decidimos trabajar con modelos animales que representan mejor que los sistemas *in vitro*, la complejidad y heterogeneidad tumoral. Elegimos modelos animales que mimetizaran la estructura de los tumores humanos, como son los modelos PDX y ratones genéticamente modificados con adenocarcinoma de pulmón. Tras caracterizar nuestro panel de trece modelos PDX, elegimos dos para

estimularlos con IL-11, lo cual aumentó ligeramente el tamaño de los tumores y correlacionó con mayores niveles de expresión de las proteínas de proliferación Ki67 y Ciclina D1, además de con mayor activación de la proteína STAT3 en uno de los modelos. Por otro lado, estimulamos con IL-11 también el modelo *KRAS*^{LSLG12Vgeo}*P53*^{LoxP}, en el que habíamos inducido previamente el desarrollo de adenocarcinomas de pulmón, resultando en un aumento, aunque no estadísticamente significativo, en el tamaño de tumores y en el número de los mismos. Este resultado confirma el efecto pro-oncogénico de IL-11, que hemos descrito en apartados anteriores, en ensayos *in vitro* y en ensayos *in vivo* con *xenografts* de líneas celulares. Sin embargo, el efecto pro-tumorigénico encontrado en estos modelos fue menor al esperado, lo que creemos puede deberse de nuevo, a la imposibilidad de mantener una activación más continua y prolongada en el tiempo de las vías de señalización, así como por la dificultad de los ratones inmunodeprimidos para reflejar los efectos globales de la IL-11 en el microambiente. En relación a trabajos anteriores, hasta el momento no se había estudiado su papel sobre modelos PDX, pero sí se ha estudiado su efecto en otros modelos genéticamente modificados con tumores gástricos, en los cuales ratones *knockin* para GP130 y *knockout* para IL-11RA desarrollaron menos tumores que animales *wild type* para este gen [187], lo que concuerda con nuestros resultados. Actualmente contamos en nuestro laboratorio con el mismo modelo murino *knockout* para IL-11RA, que será utilizado en experimentos futuros. Esto nos permitirá estudiar no solo el rol de IL-11/IL11-RA en las etapas iniciales de la tumorigénesis, sino también el efecto en la conformación del microambiente tumoral y sus diferentes componentes. De modo complementario estudiaremos su efecto en el contexto de exposición a continua a humo de tabaco, tratando de remedar las condiciones más habituales de la adenocarcinomatosis pulmonar.

En cuanto al papel de IL-11 como biomarcador, en nuestro laboratorio ya fue descrito con anterioridad su papel como herramienta diagnóstica en pacientes con adenocarcinoma, al mostrar éstos, en muestras de lavado broncoalveolar, mayor expresión de IL-11 en comparación con pacientes sin cáncer de pulmón, pacientes con EPOC y pacientes con otros subtipos histológicos de cáncer de pulmón [59]. Para estudiar su posible papel como biomarcador pronóstico utilizamos primero una cohorte propia de pacientes con adenocarcinoma de pulmón en estadios tempranos resecados y, después, los datos de expresión de ARNm de una cohorte pública de la TCGA para validar nuestros resultados. Vimos que, en ambas cohortes, los niveles elevados de la expresión proteica o de ARNm de IL-11 correlacionaban con una menor supervivencia global, es decir, con un peor pronóstico. Estos datos coinciden con los descritos por otros autores en carcinoma de endometrio [208], gástrico [209], de mama [210] y de pulmón [194]. Por otro

lado, en nuestros análisis, el pronóstico empeoraba si los pacientes tenían alta expresión concurrente de IL-11 e IL-11RA, lo que concuerda con el resultado obtenido en el experimento *in vivo* de co-inyección de células con sobre-expresión de IL-11 y células con sobreexpresión de IL-11RA, en el cual los tumores generados eran de mayor tamaño que los provenientes de células que solo sobre-expresaban IL-11 aisladamente. De esta manera confirmamos el papel oncogénico de IL-11 que hemos descrito con nuestros experimentos *in vitro* e *in vivo*.

Habiendo definido el papel de IL-11 en la biología del adenocarcinoma de pulmón y su efecto en la prognosis, se decidió explorar su potencial efecto como diana terapéutica. Por ello desarrollamos, en colaboración con las unidades de anticuerpos monoclonales y de cristalografía e ingeniería de proteínas del CNIO, un anticuerpo neutralizante para IL-11RA. Este anticuerpo puede reconocer a la subunidad específica del receptor de IL-11 y unirse a él, bloqueando la activación de las vías de señalización de IL-11. Para testar su eficacia como estrategia terapéutica, tratamos un modelo PDX con altos niveles de IL-11, y vimos que el anticuerpo reducía significativamente el crecimiento de los tumores en comparación con los animales tratados con vehículos o con el anticuerpo anti-GST, como control de efectos inespecíficos. De esta manera, demostramos que la inhibición de IL-11, podría ser una razonable estrategia terapéutica en un futuro para pacientes con adenocarcinoma de pulmón y expresión elevada de IL-11. Otros autores han descrito también efectos similares al inhibir la vía de IL-11 con el inhibidor muteína en carcinomas de colon [143], el anticuerpo neutralizante de IL-11RA en tumores de endometrio [160] y el anticuerpo neutralizante de IL-11 en cáncer no microcítico de pulmón [194]. Sin embargo, en ninguno de los estudios mencionados se utilizaron modelos PDX, como es nuestro caso, los cuales podrían ser mas adecuados al preservar en mayor medida las propiedades del tumor original humano del que provienen.

A pesar de la consistencia entre nuestros datos *in vitro*, *in vivo* y clínicos, el estudio aquí expuesto presenta ciertas limitaciones. En primer lugar, sería necesario determinar en mayor profundidad qué genes alteran su expresión a través de la regulación de STAT1 y STAT3 mediada por IL-11. Para ello, en colaboración con la unidad de genómica del CNIO, se está llevando a cabo un ensayo de ARNseq en el cual se analizarán los cambios de expresión de genes en células tumorales con sobre-expresión y silenciamiento de IL-11, además de determinar los cambios producidos en co-cultivos con fibroblastos con sobre-expresión y silenciamiento de esta citoquina. Por otra parte, contamos con limitaciones técnicas que no nos han permitido hacer ensayos *in vitro* e *in vivo* con estimulación exógena por IL-11 prolongada, por la imposibilidad de añadirla o administrarla de forma continua, lo que ha limitado el efecto observado en nuestros

ensayos. También en relación al efecto de IL-11 en fibroblastos, sería necesario ahondar más en el estudio de los cambios observados en el secretoma ya que, debido a la complejidad de las interacciones entre moléculas en el microambiente tumoral, se necesitaría estudiar con más detenimiento todas las posibles relaciones entre las citoquinas que han mostrado cambios en su patrón de secreción inducidos por IL-11. Además, sería necesario confirmar cómo estos cambios influyen en las células inmunes que infiltran el tumor *in vivo*, lo cual podría hacerse estudiando el patrón de células inmunes mediante tinciones inmunohistoquímicas y estudios de citometría específicos en los modelos animales que ya hemos generado, además de en modelos *xenograft* de co-inyección de fibroblastos con silenciamiento y sobre-expresión de IL-11 junto con células tumorales. Con respecto al papel pronóstico de IL-11, hemos observado que el efecto en la supervivencia de pacientes es más claro en el caso de IL-11 que en el de IL-11RA, ya que se observó una tendencia a una menor supervivencia en pacientes con altos niveles del receptor de IL-11, pero sin significancia estadística en la mayoría de los casos. En esta misma cohorte vamos a estudiar, mediante tinciones inmunohistoquímicas, el patrón de células inmunes para así relacionarlo con el resultado obtenido en el estudio del secretoma de fibroblastos. Finalmente, en cuanto al efecto del anticuerpo neutralizante de IL-11RA, sería necesario confirmar el hallazgo encontrado en una cohorte mayor de modelos PDXs, como primer paso hacia la aplicación clínica potencial de esta aproximación terapéutica. Actualmente, en nuestro laboratorio se está ampliando la cohorte de modelos PDXs tratados. Adicionalmente, pretendemos estudiar el efecto combinado con otros agentes terapéuticos como quimioterápicos (platinos, pemetrexed, taxanos), inhibidores de PD-1/PD-L1, e inhibidores de IL-1 (p.e. canakinumab) [211][212] entre otros en modelos apropiados incluyendo aquellos en ratones inmunocompetentes.

En conclusión, a la luz de los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo*, se propone un modelo de oncogénesis en el cual la IL-11, secretada en mayor medida por fibroblastos, pero también por algunas células tumorales, ejerce un papel directo pro-oncogénico sobre las propias células tumorales, sobre todo a través de la activación de la vía JAK/STAT, y un efecto indirecto sobre los fibroblastos, en los que activa las rutas JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT. Además, IL-11 puede promover la proliferación y migración en los fibroblastos y cambiar su patrón secretor, lo que podría influir activamente sobre el microambiente tumoral y sobre el tumor (Figura 39). Además, la evidencia obtenida de su papel pronóstico a nivel clínico apoya este modelo, y sugiere su posible utilidad como biomarcador pronóstico en pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Igualmente, nuestros datos sugieren que la inhibición de la vía IL-11/IL-11RA

podría suponer una futura estrategia terapéutica en pacientes con adenocarcinoma de pulmón con niveles elevados de IL-11 que sería interesante testar en el contexto clínico.

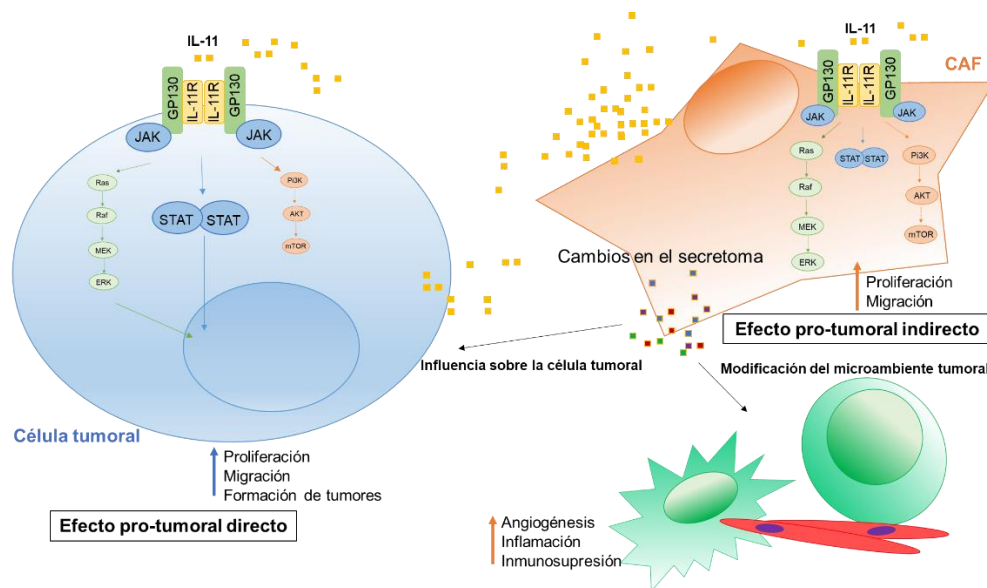


Figura 39. Modelo del papel de IL-11 en la biología del adenocarcinoma de pulmón. La IL-11, secretada por células tumorales y, en mayor cantidad, por fibroblastos asociados al tumor, ejerce un efecto pro-tumoral en el adenocarcinoma de pulmón. En la célula tumoral, IL-11 activa sobre todo la vía JAK/STAT, lo que aumenta sus propiedades tumorales. En los fibroblastos, IL-11 activa las vías JAK/STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT, y favorece la proliferación y la migración, además de modificar el perfil de secreción de determinadas citoquinas y factores de crecimiento. Esta modificación a su vez puede promover cambios del microambiente, haciéndolo más pro-tumoral, y también puede influir sobre las células tumorales, aumentando sus propiedades tumorigénicas.

CONCLUSIONES

1. La estimulación de líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón con IL-11 induce una activación transitoria de las proteínas STAT1 y STAT3, que se traduce en un ligero aumento de algunas propiedades pro-tumorales *in vitro* y más pronunciado *in vivo*.
2. El silenciamiento de IL-11 y de su receptor específico IL-11RA en líneas celulares de adenocarcinoma producen una disminución de la activación de las proteínas STAT1 y STAT3 sostenida, que se traduce en una disminución significativa de las propiedades tumorales, tanto *in vitro* como *in vivo*. Tales efectos sugieren el potencial de la inhibición de la señalización de IL-11/IL-11RA como estrategia terapéutica.
3. Los fibroblastos asociados a tumor (CAFs) secretan cantidades relevantes de IL-11, superiores a aquellas producidas por las células tumorales, lo que sugiere que son una fuente relevante de secreción de esta citoquina en los tumores. Además, las células tumorales inducen un incremento en la secreción de IL-11 por parte de los CAFs, y el silenciamiento de IL-11 en los fibroblastos reduce su capacidad de proliferación y migración.
4. La sobre-expresión y el silenciamiento de IL-11 en los fibroblastos producen un cambio en el perfil de secreción de un conjunto de citoquinas y factores de crecimiento que pueden intervenir en la progresión tumoral. Entre ellos, cabe destacar VEGF-A, IL-6 y RANTES, cuyos niveles de expresión aumentan significativamente cuando se sobre-expresa IL-11 y disminuyen cuando se silencia.
5. La estimulación con IL-11 en modelos animales de adenocarcinoma de pulmón produce un incremento en el crecimiento de los tumores en modelos PDX y un incremento en el tamaño y número de tumores en el modelo *KRAS^{LSLG12Vgeo};P53^{loxP}*. Además, en ambos casos este incremento en el crecimiento va acompañado de un incremento en la fosforilación de STAT3 y en la expresión de las proteínas Ciclina D1 y Ki67.
6. Existe una correlación entre la expresión tumoral de IL-11 y la supervivencia, de modo que los pacientes afectados de tumores con niveles de expresión de IL-11 elevados, presentan menor supervivencia global. Estos datos apoyan la potencial utilidad de IL-11 como biomarcador pronóstico.

7. Un anticuerpo neutralizante de IL-11RA, desarrollado en este proyecto, ha demostrado tener efecto anti-tumoral en modelos PDX de adenocarcinoma de pulmón. Este resultado confirma que la vía de IL-11 representa una diana terapéutica potencial que amerita validación en el contexto del cáncer de pulmón, particularmente en la clínica.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. S. Y. Wong, "Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment," *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2011.
- [2] M. Collado *et al.*, "Tumour biology: Senescence in premalignant tumours," *Nature*, 2005.
- [3] S. Lee and C. A. Schmitt, "The dynamic nature of senescence in cancer," *Nature Cell Biology*. 2019.
- [4] M. H. Bailey *et al.*, "Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations," *Cell*, 2018.
- [5] P. C. Nowell, "The clonal evolution of tumor cell populations.," *Science*, 1976.
- [6] N. McGranahan and C. Swanton, "Clonal Heterogeneity and Tumor Evolution: Past, Present, and the Future," *Cell*. 2017.
- [7] T. A. Lehman *et al.*, "Oncogenes and tumor-suppressor genes," in *Environmental Health Perspectives*, 1991.
- [8] Y. K. Chae *et al.*, "Genomic landscape of DNA repair genes in cancer," *Oncotarget*, 2016.
- [9] G. Stanta and S. Bonin, "Overview on Clinical Relevance of Intra-Tumor Heterogeneity," *Front. Med.*, 2018.
- [10] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer.," *Cell*, 2000.
- [11] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, vol. 144, no. 5. pp. 646–674, 2011.
- [12] M. Barbacid, "Ras Genes," *Annu. Rev. Biochem.*, 2002.
- [13] T. K. Hayes and C. J. Der, "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of RAS mutant cancers," in *Ras Superfamily Small G Proteins: Biology and Mechanisms 1: General Features, Signaling*, 2014.
- [14] R. Vélez-Cruz and D. G. Johnson, "The retinoblastoma (RB) tumor suppressor: Pushing back against genome instability on multiple fronts," *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
- [15] M. Napoli and E. R. Flores, "The p53 family orchestrates the regulation of metabolism: Physiological regulation and implications for cancer therapy," *British Journal of Cancer*. 2017.

- [16] B. J. Aubrey, G. L. Kelly, A. Janic, M. J. Herold, and A. Strasser, "How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?," *Cell Death and Differentiation*. 2018.
- [17] M. A. Jafri, S. A. Ansari, M. H. Alqahtani, and J. W. Shay, "Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies," *Genome Medicine*. 2016.
- [18] S. Zeng, W. H. Shen, and L. Liu, "Senescence and Cancer.," *Cancer Transl. Med.*, vol. 4, no. 3, pp. 70–74, 2018.
- [19] D. I. R. Holmes and I. Zachary, "The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: Angiogenic factors in health and disease," *Genome Biology*. 2005.
- [20] H. L. Goel and A. M. Mercurio, "VEGF targets the tumour cell," *Nature Reviews Cancer*. 2013.
- [21] G. Berx and F. van Roy, "Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer.," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2009.
- [22] A. M. Mendonsa, T. Y. Na, and B. M. Gumbiner, "E-cadherin in contact inhibition and cancer," *Oncogene*. 2018.
- [23] J. Roche, "The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer.," *Cancers (Basel)*., vol. 10, no. 2, Feb. 2018.
- [24] R. J. DeBerardinis and N. S. Chandel, "Fundamentals of cancer metabolism.," *Sci. Adv.*, 2016.
- [25] M. V. Liberti and J. W. Locasale, "The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?," *Trends in Biochemical Sciences*. 2016.
- [26] M. D. Wellenstein and K. E. de Visser, "Cancer-Cell-Intrinsic Mechanisms Shaping the Tumor Immune Landscape," *Immunity*. 2018.
- [27] D. Escors *et al.*, "The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells," *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2018.
- [28] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis, "Genomic instability an evolving hallmark of cancer," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010.
- [29] S. I. Grivennikov, F. R. Greten, and M. Karin, "Immunity, Inflammation, and Cancer," *Cell*. 2010.
- [30] A. Mantovani, P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill, "Cancer-related inflammation,"

- Nature*. 2008.
- [31] L. M. Coussens and Z. Werb, "Inflammation and cancer," *Nature*. 2002.
 - [32] J. Candido and T. Hagemann, "Cancer-related inflammation," *J. Clin. Immunol.*, 2013.
 - [33] S. Kumar, C. J. Chan, and L. M. Coussens, "Inflammation and Cancer," in *Encyclopedia of Immunobiology*, 2016.
 - [34] F. Cammarota and M. O. Laukkanen, "Mesenchymal stem/stromal cells in stromal evolution and cancer progression," *Stem Cells International*. 2016.
 - [35] A. Calon *et al.*, "Dependency of Colorectal Cancer on a TGF- β -Driven Program in Stromal Cells for Metastasis Initiation," *Cancer Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 571–584, 2012.
 - [36] K. M. Bussard, L. Mutkus, K. Stumpf, C. Gomez-Manzano, and F. C. Marini, "Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment," *Breast Cancer Research*. 2016.
 - [37] D. F. Quail and J. A. Joyce, "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis.," *Nat. Med.*, 2013.
 - [38] M. Wang *et al.*, "Role of tumor microenvironment in tumorigenesis," *Journal of Cancer*. 2017.
 - [39] S. Buczacki, "Cancer Stem Cells," in *Encyclopedia of Cell Biology*, 2015.
 - [40] L. Li and W. B. Neaves, "Normal stem cells and cancer stem cells: The niche matters," *Cancer Research*. 2006.
 - [41] F. Xing, J. Saidou, and K. Watabe, "Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment.," *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*, vol. 15, pp. 166–79, Jan. 2010.
 - [42] S. Vicent *et al.*, "Cross-species functional analysis of cancer-associated fibroblasts identifies a critical role for CLCF1 and IL-6 in non-small cell lung cancer in vivo," *Cancer Res.*, vol. 72, no. 22, pp. 5744–5756, 2012.
 - [43] K. Shiga, M. Hara, T. Nagasaki, T. Sato, H. Takahashi, and H. Takeyama, "Cancer-associated fibroblasts: Their characteristics and their roles in tumor growth," *Cancers*. 2015.
 - [44] K. Hida, N. Maishi, D. A. Annan, and Y. Hida, "Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 5, Apr. 2018.

- [45] A. L. Ribeiro and O. K. Okamoto, "Combined effects of pericytes in the tumor microenvironment.," *Stem Cells Int.*, vol. 2015, p. 868475, 2015.
- [46] R. Shayan, M. G. Achen, and S. A. Stacker, "Lymphatic vessels in cancer metastasis: Bridging the gaps," *Carcinogenesis*. 2006.
- [47] H. Ungefroren, F. Gieseler, S. Fliedner, and H. Lehnert, "Obesity and cancer," *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.*, 2015.
- [48] A. J. Cozzo, A. M. Fuller, and L. Makowski, "Contribution of Adipose Tissue to Development of Cancer.," *Compr. Physiol.*, vol. 8, no. 1, pp. 237–282, 2017.
- [49] M. N. Duong, A. Geneste, F. Fallone, X. Li, C. Dumontet, and C. Muller, "The fat and the bad: Mature adipocytes, key actors in tumor progression and resistance.," *Oncotarget*, vol. 8, no. 34, pp. 57622–57641, Aug. 2017.
- [50] F. Cavallo, C. De Giovanni, P. Nanni, G. Forni, and P. L. Lollini, "2011: The immune hallmarks of cancer," in *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2011.
- [51] H. Gonzalez, C. Hagerling, and Z. Werb, "Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression," *Genes & development*. 2018.
- [52] D. Ribatti, "The concept of immune surveillance against tumors: The first theories," *Oncotarget*, 2016.
- [53] N. B. Hao, M. H. Lü, Y. H. Fan, Y. L. Cao, Z. R. Zhang, and S. M. Yang, "Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors," *Clinical and Developmental Immunology*. 2012.
- [54] L. N. Dahal, "The dichotomy of T helper 17 cells in cancer," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 17, no. 9, pp. 592–592, Sep. 2017.
- [55] M. Binnewies *et al.*, "Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy.," *Nat. Med.*, vol. 24, no. 5, pp. 541–550, 2018.
- [56] S. Scrimini, J. Pons, and J. Saulea, "Myeloid-Derived Suppressor Cells: Possible Link Between Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Lung Cancer," *Archivos de Bronconeumología*. 2016.
- [57] V. Kumar, S. Patel, E. Tcyganov, and D. I. Gabrilovich, "The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment.," *Trends Immunol.*, 2016.
- [58] M. Murata, "Inflammation and cancer," *Environ. Health Prev. Med.*, vol. 23, no. 1,

- p. 50, Dec. 2018.
- [59] M. D. Pastor *et al.*, “IL-11 and CCL-1: Novel Protein Diagnostic Biomarkers of Lung Adenocarcinoma in Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF),” *J. Thorac. Oncol.*, vol. 11, no. 12, pp. 2183–2192, 2016.
 - [60] S. Wu *et al.*, “A human colonic commensal promotes colon tumorigenesis via activation of T helper type 17 T cell responses,” *Nat. Med.*, 2009.
 - [61] M. Karin, “Nuclear factor- κ B in cancer development and progression,” *Nature*, 2006.
 - [62] H. Takahashi, H. Ogata, R. Nishigaki, and D. H. Broide, “Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKK β and JNK1 dependent inflammation,” *Cancer Cell*, 2011.
 - [63] C. Dostert, V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B. T. Mossman, and J. Tschopp, “Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica,” *Science* (80-.), 2008.
 - [64] C. N. Bernstein, J. F. Blanchard, E. Kliever, and a Wajda, “Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study.,” *Cancer*, 2001.
 - [65] S. G. Spiro and F. McCaughan, “COPD and Lung Cancer,” in *Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 2008, pp. 538–545.
 - [66] A. Punturieri, E. Szabo, T. L. Croxton, S. D. Shapiro, and S. M. Dubinett, “Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: Needs and opportunities for integrated research,” *Journal of the National Cancer Institute*. 2009.
 - [67] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, “Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 6, pp. 394–424, Nov. 2018.
 - [68] “Las cifras del cáncer en España,” 2019.
 - [69] S. Pomplun, “Pathology of lung cancer,” in *Lung Cancer*, 2006.
 - [70] R. S. Herbst, J. V. Heymach, and S. M. Lippman, “Lung cancer.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 13, pp. 1367–80, 2008.
 - [71] Y. Ohno, H. Koyama, and J. Dinkel, “Lung cancer,” in *Medical Radiology*, 2018.
 - [72] M. Zheng, “Classification and Pathology of Lung Cancer,” *Surgical Oncology*

- Clinics of North America*. 2016.
- [73] R. S. Heist and J. A. Engelman, "SnapShot: Non-Small Cell Lung Cancer," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3. 2012.
 - [74] W. A. Cooper, D. C. L. Lam, S. A. O'Toole, and J. D. Minna, "Molecular biology of lung cancer.," *J. Thorac. Dis.*, 2013.
 - [75] C. Swanton and R. Govindan, "Clinical Implications of Genomic Discoveries in Lung Cancer," *N. Engl. J. Med.*, 2016.
 - [76] R. S. Herbst, D. Morgensztern, and C. Boshoff, "The biology and management of non-small cell lung cancer," *Nature*. 2018.
 - [77] J. Gu *et al.*, "TP53 mutation is associated with a poor clinical outcome for non-small cell lung cancer: Evidence from a meta-analysis," *Mol. Clin. Oncol.*, 2016.
 - [78] N. Karachaliou *et al.*, "KRAS mutations in lung cancer," *Clinical Lung Cancer*. 2013.
 - [79] M. Zeng *et al.*, "Potent and Selective Covalent Quinazoline Inhibitors of KRAS G12C," *Cell Chem. Biol.*, 2017.
 - [80] D. B. Shackelford *et al.*, "LKB1 Inactivation Dictates Therapeutic Response of Non-Small Cell Lung Cancer to the Metabolism Drug Phenformin," *Cancer Cell*, 2013.
 - [81] F. Skoulidis, B. W. Carter, J. Zhang, I. I. Wistuba, V. Papadimitrakopoulou, and J. Heymach, "Association of STK11/LKB1 mutations with primary resistance to PD-1/PD-L1 axis blockade in PD-L1 positive non-squamous NSCLC.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 36, no. 15_suppl, pp. 9028–9028, May 2018.
 - [82] G. Q. *et al.*, "Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Kinase Inhibitors and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) – Advances in Molecular Diagnostic Techniques to Facilitate Targeted Therapy," *Pathol. Oncol. Res.*, 2018.
 - [83] I. Sullivan and D. Planchard, "ALK inhibitors in non-small cell lung cancer: The latest evidence and developments," *Therapeutic Advances in Medical Oncology*. 2016.
 - [84] J. M. Hatcher and N. S. Gray, "Small molecule inhibitors of ALK," in *Topics in Medicinal Chemistry*, 2018.
 - [85] D. Alrifai, M. D. Forster, and S. M. Janes, "Emerging resistance pathways in lung

- cancer: what has ROS-1 taught us?," *Transl. Lung Cancer Res.*, 2018.
- [86] M. S. Brose *et al.*, "BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma.," *Cancer Res.*, 2002.
- [87] T. Nguyen-Ngoc, H. Bouchaab, A. A. Adjei, and S. Peters, "BRAF alterations as therapeutic targets in non-small-cell lung cancer," *Journal of Thoracic Oncology*. 2015.
- [88] R. Ferrara, N. Auger, E. Auclin, and B. Besse, "Clinical and Translational Implications of RET Rearrangements in Non–Small Cell Lung Cancer," *Journal of Thoracic Oncology*. 2018.
- [89] V. Subbiah *et al.*, "Precision Targeted Therapy with BLU-667 for *RET* -Driven Cancers," *Cancer Discov.*, vol. 8, no. 7, pp. 836–849, Jul. 2018.
- [90] G. Bronte, P. Ulivi, A. Verlicchi, P. Cravero, A. Delmonte, and L. Crinò, "Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer: future prospects.," *Lung Cancer (Auckland, N.Z.)*, vol. 10, pp. 27–36, 2019.
- [91] Y. L. Wu *et al.*, "Phase Ib/II Study of Capmatinib (INC280) Plus Gefitinib after Failure of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Inhibitor Therapy in Patients with EGFR-Mutated, MET Factor-Dysregulated Non-Small-Cell Lung Cancer," *J. Clin. Oncol.*, 2018.
- [92] S. Baltschukat *et al.*, " Capmatinib (INC280) Is Active Against Models of Non-Small Cell Lung Cancer and Other Cancer Types with Defined Mechanisms of MET Activation ," *Clin. Cancer Res.*, 2019.
- [93] E. Sen, G. Yavas, and O. Ata, "HER-2 mutations in non-small cell lung cancer," *Medical Journal of Bakirkoy*. 2018.
- [94] K. Hotta *et al.*, "A Phase II Study of Trastuzumab Emtansine in HER2-Positive Non–Small Cell Lung Cancer," *J. Thorac. Oncol.*, 2018.
- [95] A. F. Farago *et al.*, "Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring an NTRK Gene Fusion.," *JCO Precis. Oncol.*, vol. 2018, 2018.
- [96] A. Drilon *et al.*, "Efficacy of Larotrectinib in TRK Fusion-Positive Cancers in Adults and Children.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, no. 8, pp. 731–739, 2018.
- [97] K. Taniguchi and M. Karin, "IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer," *Seminars in Immunology*, vol. 26, no. 1. pp. 54–74, 2014.

- [98] R. Eulendorf *et al.*, "Interleukin-6 signalling: More than Jaks and STATs," *European Journal of Cell Biology*. 2012.
- [99] P. C. HEINRICH, I. BEHRMANN, S. HAAN, H. M. HERMANN, G. MÜLLER-NEWEN, and F. SCHAPER, "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation," *Biochem. J.*, 2003.
- [100] C. Garbers *et al.*, "Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines," *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2012.
- [101] T. Kishimoto, "IL-6: From its discovery to clinical applications," *Int. Immunol.*, 2010.
- [102] T. Putoczki and M. Ernst, "More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer," *J. Leukoc. Biol.*, 2010.
- [103] C. Garbers and J. Scheller, "Interleukin-6 and interleukin-11: Same same but different," *Biological Chemistry*. 2013.
- [104] S. J. Thomas, J. A. Snowden, M. P. Zeidler, and S. J. Danson, "The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours," *Br. J. Cancer*, 2015.
- [105] M. Howlett, T. R. Menheniott, L. M. Judd, and A. S. Giraud, "Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2009.
- [106] A. Mansell and B. J. Jenkins, "Dangerous liaisons between interleukin-6 cytokine and toll-like receptor families: A potent combination in inflammation and cancer," *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2013.
- [107] T. L. Putoczki and M. Ernst, "IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer," *Immunotherapy*, vol. 7, no. 4, pp. 441–453, 2015.
- [108] A. Yoshimura, T. Naka, and M. Kubo, "SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation," *Nature Reviews Immunology*. 2007.
- [109] A. Yoshimura and H. Yasukawa, "JAK's SOCS: A Mechanism of Inhibition," *Immunity*. 2012.
- [110] D. H. Xu, Z. Zhu, M. R. Wakefield, H. Xiao, Q. Bai, and Y. Fang, "The role of IL-11 in immunity and cancer," *Cancer Letters*, vol. 373, no. 2. pp. 156–163, 2016.
- [111] V. Lay, J. Yap, S. Sonderegger, and E. Dimitriadis, "Interleukin 11 regulates

- endometrial cancer cell adhesion and migration via STAT3," *Int. J. Oncol.*, vol. 41, no. 2, pp. 759–764, 2012.
- [112] M. Ernst *et al.*, "STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice," *J. Clin. Invest.*, 2008.
- [113] B. Cseh, E. Doma, and M. Baccharini, "'raf' neighborhood: Protein-protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway," *FEBS Letters*. 2014.
- [114] J. A. McCubrey *et al.*, "Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2007.
- [115] G. Song, G. Ouyang, and S. Bao, "The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005.
- [116] D. A. Fruman and C. Rommel, "PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities," *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2014.
- [117] F. Janku, T. A. Yap, and F. Meric-Bernstam, "Targeting the PI3K pathway in cancer: Are we making headway?," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018.
- [118] D. T. Fisher, M. M. Appenheimer, and S. S. Evans, "The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment," *Seminars in Immunology*. 2014.
- [119] C. A. Hunter and S. A. Jones, "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease.," *Nat. Immunol.*, 2015.
- [120] A. V. Villarino, Y. Kanno, and J. J. O'Shea, "Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system," *Nature Immunology*. 2017.
- [121] S. A. Jones and B. J. Jenkins, "Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer," *Nature Reviews Immunology*. 2018.
- [122] K. Taniguchi and M. Karin, "IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer," *Seminars in Immunology*. 2014.
- [123] D. E. Johnson, R. A. O'Keefe, and J. R. Grandis, "Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer," *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2018.
- [124] S. Rose-John, "Interleukin-6 Family Cytokines," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 10, no. 2, p. a028415, Feb. 2018.
- [125] T. Komori and Y. Morikawa, "Oncostatin M in the development of metabolic

- syndrome and its potential as a novel therapeutic target," *Anatomical Science International*. 2018.
- [126] T. R. Flint *et al.*, "Tumor-Induced IL-6 Reprograms Host Metabolism to Suppress Anti-tumor Immunity," *Cell Metab.*, 2016.
- [127] L. Yu *et al.*, "Clinical utility of a STAT3-regulated miRNA-200 family signature with prognostic potential in early gastric cancer," *Clin. Cancer Res.*, 2018.
- [128] N. J. Sullivan *et al.*, "Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells," *Oncogene*, 2009.
- [129] N. Gawlik-Rzemieniewska and I. Bednarek, "The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells," *Cancer Biology and Therapy*. 2016.
- [130] M. Ernst and T. L. Putoczki, "Targeting IL-11 signaling in colon cancer," *Oncotarget*, 2015.
- [131] M. Ernst *et al.*, "STAT3 and STAT1 mediate IL-11-dependent and inflammation-associated gastric tumorigenesis in gp130 receptor mutant mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 118, no. 5, pp. 1727–1738, 2008.
- [132] H. Tye *et al.*, "STAT3-Driven Upregulation of TLR2 Promotes Gastric Tumorigenesis Independent of Tumor Inflammation," *Cancer Cell*, 2012.
- [133] X. Li *et al.*, "LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway," *Oncotarget*, 2015.
- [134] H. Zeng *et al.*, "Feedback Activation of Leukemia Inhibitory Factor Receptor Limits Response to Histone Deacetylase Inhibitors in Breast Cancer," *Cancer Cell*, 2016.
- [135] K. Shien *et al.*, "JAK1/STAT3 Activation through a Proinflammatory Cytokine Pathway Leads to Resistance to Molecularly Targeted Therapy in Non–Small Cell Lung Cancer," *Mol. Cancer Ther.*, 2017.
- [136] E. Ferretti, A. Corcione, and V. Pistoia, "The IL-31/IL-31 receptor axis: general features and role in tumor microenvironment," *J. Leukoc. Biol.*, 2017.
- [137] C. Cocco *et al.*, "Interleukin-27 acts as multifunctional antitumor agent in multiple myeloma," *Clin. Cancer Res.*, 2010.
- [138] C.-M. Pan, M.-L. Wang, S.-H. Chiou, H.-Y. Chen, and C.-W. Wu, "Oncostatin M suppresses metastasis of lung adenocarcinoma by inhibiting SLUG expression

- through coordination of STATs and PIASs signalings,” *Oncotarget*, 2016.
- [139] A. A. Hurwitz and S. K. Watkins, “Immune suppression in the tumor microenvironment: A role for dendritic cell-mediated tolerization of T cells,” *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2012.
- [140] T. Kato *et al.*, “Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8⁺ and FoxP3⁺ T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 24, no. 19, pp. 4820–4833, Oct. 2018.
- [141] A. Kimura and T. Kishimoto, “IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 40, no. 7, pp. 1830–1835, Jul. 2010.
- [142] X. Zhang *et al.*, “IL-11 Induces Th17 Cell Responses in Patients with Early Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis,” *J. Immunol.*, 2015.
- [143] T. L. Putoczki *et al.*, “Interleukin-11 is the dominant IL-6 family cytokine during gastrointestinal tumorigenesis and can be targeted therapeutically,” *Cancer Cell*, vol. 24, no. 2, pp. 257–271, 2013.
- [144] M. Pascual-García *et al.*, “LIF regulates CXCL9 in tumor-associated macrophages and prevents CD8⁺ T cell tumor-infiltration impairing anti-PD1 therapy,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 2416, Dec. 2019.
- [145] M. Fabbi, G. Carbotti, and S. Ferrini, “Dual Roles of IL-27 in Cancer Biology and Immunotherapy,” *Mediators Inflamm.*, 2017.
- [146] A. Winship, M. Van Sinderen, K. Rainczuk, and E. Dimitriadis, “Therapeutically blocking Interleukin-11 Receptor- α enhances doxorubicin cytotoxicity in high grade type I endometrioid tumours,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 14, pp. 22716–22729, Apr. 2017.
- [147] D. HARMEGNIES *et al.*, “Characterization of a potent human interleukin-11 agonist,” *Biochem. J.*, 2003.
- [148] A. Mantovani, I. Barajon, and C. Garlanda, “IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy,” *Immunol. Rev.*, vol. 281, no. 1, pp. 57–61, 2018.
- [149] A. Gottschlich, S. Endres, and S. Kobold, “Can we use interleukin-1 β blockade for lung cancer treatment?,” *Transl. Lung Cancer Res.*, vol. 7, no. Suppl 2, p. S160, 2018.
- [150] V. O. Lewis *et al.*, “BMTP-11 is active in preclinical models of human

- osteosarcoma and a candidate targeted drug for clinical translation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 30, pp. 8065–8070, Jul. 2017.
- [151] G. Huang, L. Yu, L. J. Cooper, M. Hollomon, H. Huls, and E. S. Kleinerman, “Genetically modified T cells targeting interleukin-11 receptor α -chain kill human osteosarcoma cells and induce the regression of established osteosarcoma lung metastases,” *Cancer Res.*, vol. 72, no. 1, pp. 271–81, Jan. 2012.
- [152] C. Garbers, S. Heink, T. Korn, and S. Rose-John, “Interleukin-6: Designing specific therapeutics for a complex cytokine,” *Nature Reviews Drug Discovery*. 2018.
- [153] J. F. Rossi, Z. Y. Lu, M. Jourdan, and B. Klein, “Interleukin-6 as a therapeutic target,” *Clinical Cancer Research*. 2015.
- [154] Y. Guo, F. Xu, T. Lu, Z. Duan, and Z. Zhang, “Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer,” *Cancer Treatment Reviews*. 2012.
- [155] M. Schuster, J. R. Rigas, S. V. Orlov, B. Milovanovic, K. Prabhash, and J. T. Smith, “ALD518, a humanized anti-IL-6 antibody, treats anemia in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled trial,” *J. Clin. Oncol.*, 2017.
- [156] Y. Guo, F. Xu, T. Lu, Z. Duan, and Z. Zhang, “Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer,” *Cancer Treatment Reviews*. 2012.
- [157] J. R. Rigas, M. Schuster, S. V. Orlov, B. Milovanovic, K. Prabhash, and J. T. Smith, “Effect of ALD518, a humanized anti-IL-6 antibody, on lean body mass loss and symptoms in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a phase II randomized, double-blind safety and efficacy trial,” *J. Clin. Oncol.*, 2017.
- [158] J. H. Lim, “Inhibition of the interleukin-11-STAT3 axis attenuates hypoxia-induced migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells,” *Korean J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 18, no. 5, pp. 391–396, 2014.
- [159] M. Zhao *et al.*, “Upregulation of IL-11, an IL-6 Family Cytokine, Promotes Tumor Progression and Correlates with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer,” *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 45, no. 6, pp. 2213–2224, 2018.
- [160] A. L. Winship, M. Van Sinderen, J. Donoghue, K. Rainczuk, and E. Dimitriadis, “Targeting Interleukin-11 Receptor- Impairs Human Endometrial Cancer Cell

- Proliferation and Invasion in vitro and Reduces Tumour Growth and Metastasis in vivo.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 15, no. April, pp. 720–730, 2016.
- [161] R. Pasqualini *et al.*, "Targeting the interleukin-11 receptor α in metastatic prostate cancer: A first-in-man study.," *Cancer*, vol. 121, no. 14, pp. 2411–21, Jul. 2015.
- [162] S. Xu and N. Neamati, "gp130: a promising drug target for cancer therapy," *Expert Opin. Ther. Targets*, 2013.
- [163] S. Xu, F. Grande, A. Garofalo, and N. Neamati, "Discovery of a Novel Orally Active Small-Molecule gp130 Inhibitor for the Treatment of Ovarian Cancer," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 12, no. 6, pp. 937–949, Jun. 2013.
- [164] X. Wu, Y. Cao, H. Xiao, C. Li, and J. Lin, "Bazedoxifene as a Novel GP130 Inhibitor for Pancreatic Cancer Therapy.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 15, no. 11, pp. 2609–2619, 2016.
- [165] A. M. Lewis, S. Varghese, H. Xu, and H. R. Alexander, "Interleukin-1 and cancer progression: the emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment," *J. Transl. Med.*, vol. 4, p. 48, 2006.
- [166] A. Gottschlich, S. Endres, and S. Kobold, "Can we use interleukin-1 β blockade for lung cancer treatment?," *Transl. lung cancer Res.*, vol. 7, no. Suppl 2, pp. S160–S164, Apr. 2018.
- [167] R. Maier, V. Ganu, and M. Lotz, "Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases," *J. Biol. Chem.*, 1993.
- [168] C. M. Cahill and J. T. Rogers, "Interleukin (IL) 1 β Induction of IL-6 Is Mediated by a Novel Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent AKT/I κ B Kinase α Pathway Targeting Activator Protein-1," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 38, pp. 25900–25912, Sep. 2008.
- [169] T. L. Putoczki, R. C. J. Dobson, and M. D. W. Griffin, "The structure of human interleukin-11 reveals receptor-binding site features and structural differences from interleukin-6," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2014.
- [170] A. J. Davidson, S. A. Freeman, K. E. Crosier, C. R. Wood, and P. S. Crosier, "Expression of murine interleukin 11 and its receptor α -chain in adult and embryonic tissues," *Stem Cells*, 1997.
- [171] C. B. Jackson *et al.*, "Augmented gp130-mediated cytokine signalling

- accompanies human gastric cancer progression," *J. Pathol.*, 2007.
- [172] J. Yap, L. A. Salamonsen, T. Jobling, P. K. Nicholls, and E. Dimitriadis, "Interleukin 11 is upregulated in uterine lavage and endometrial cancer cells in women with endometrial carcinoma," *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 2010.
- [173] B. Singh, J. A. Berry, A. Shoher, and A. Lucci, "COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells," in *Journal of Surgical Research*, 2006.
- [174] S. Y. Shin, C. Choi, H. G. Lee, Y. Lim, and Y. H. Lee, "Transcriptional regulation of the interleukin-11 gene by oncogenic Ras," *Carcinogenesis*, 2012.
- [175] M. I. Wilde and D. Faulds, "Oprelvekin: a review of its pharmacology and therapeutic potential in chemotherapy-induced thrombocytopenia," *BioDrugs*, 1998.
- [176] H. Ghareeb and R. Karaman, "Anti-Hemorrhagic Agents," *Commonly Used Drugs-Uses, Side Eff. Bioavailab. Approaches to Improv. it*, 2015.
- [177] B. B.A., "Side Effects of Cytokines Approved for Therapy," *Drug Saf.*, 2014.
- [178] S. Schafer *et al.*, "IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis," *Nature*, 2017.
- [179] S. Cook *et al.*, "IL-11 is a therapeutic target in idiopathic pulmonary fibrosis," *bioRxiv*, 2018.
- [180] E. Gytoku, E. Morita, Y. Kameyoshi, T. Hiragun, S. Yamamoto, and M. Hide, "The il-6 family cytokines, interleukin-6, interleukin-11, oncostatin m, and leukemia inhibitory factor, enhance mast cell growth through fibroblast-dependent pathway in mice," *Arch. Dermatol. Res.*, 2001.
- [181] G. L. Chun *et al.*, "Endogenous IL-11 signaling is essential in Th2- and IL-13-induced inflammation and mucus production," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2008.
- [182] K. Mahboubi *et al.*, "Interleukin-11 up-regulates survivin expression in endothelial cells through a signal transducer and activator of transcription-3 pathway," *Lab. Investig.*, 2001.
- [183] P. Neddermannf, R. Graziani, G. Ciliberto, and G. Paonessa, "Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor α and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130," *J. Biol. Chem.*, 1996.
- [184] M. Lacroix, B. Siwek, P. J. Marie, and J. J. Body, "Production and regulation of

- interleukin-11 by breast cancer cells," *Cancer Lett.*, 1998.
- [185] H. Soda *et al.*, "Recombinant human interleukin-11 is unlikely to stimulate the growth of the most common solid tumors," *Anticancer Drugs*, 1999.
- [186] C. Sotiriou, M. Lacroix, L. Lespagnard, D. Larsimont, M. Paesmans, and J. J. Body, "Interleukins-6 and -11 expression in primary breast cancer and subsequent development of bone metastases," *Cancer Lett.*, 2001.
- [187] M. Howlett *et al.*, "The Interleukin-6 Family Cytokine Interleukin-11 Regulates Homeostatic Epithelial Cell Turnover and Promotes Gastric Tumor Development," *Gastroenterology*, vol. 136, no. 3, 2009.
- [188] S. Ollila *et al.*, "Stromal Lkb1 deficiency leads to gastrointestinal tumorigenesis involving the IL-11-JAK/STAT3 pathway.," *J. Clin. Invest.*, vol. 128, no. 1, pp. 402–414, 2018.
- [189] A. Winship, E. Menkhorst, M. Van Sinderen, and E. Dimitriadis, "Interleukin 11: Similar or opposite roles in female reproduction and reproductive cancer?," *Reproduction, Fertility and Development*. 2016.
- [190] C. Ren, Y. Chen, C. Han, D. Fu, and H. Chen, "Plasma interleukin-11 (IL-11) levels have diagnostic and prognostic roles in patients with pancreatic cancer.," *Tumour Biol.*, 2014.
- [191] D. WU, J. TAO, J. DING, P. QU, Q. LU, and W. ZHANG, "Interleukin-11, an interleukin-6-like cytokine, is a promising predictor for bladder cancer prognosis," *Mol. Med. Rep.*, vol. 7, no. 2, pp. 684–688, Feb. 2013.
- [192] D.-D. Yu *et al.*, "ILs-3, 6 and 11 increase, but ILs-10 and 24 decrease stemness of human prostate cancer cells <i>in vitro</i>," *Oncotarget*, vol. 6, no. 40, 2015.
- [193] L. Tao *et al.*, "Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway," *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- [194] M. Zhao *et al.*, "Upregulation of IL-11, an IL-6 Family Cytokine, Promotes Tumor Progression and Correlates with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer," *Cell. Physiol. Biochem.*, 2018.
- [195] K. Meissl, S. Macho-Maschler, M. Müller, and B. Strobl, "The good and the bad faces of STAT1 in solid tumours," *Cytokine*, vol. 89, pp. 12–20, Jan. 2017.

- [196] B. Xin-hua and L. Rui-yu, "Progress in research on correlation among STAT3, CyclinD1, P21 genes and tumors," *J. Otol.*, vol. 7, no. 1, pp. 19–24, Jun. 2012.
- [197] J. Luo, R. Yan, X. He, and J. He, "Constitutive activation of STAT3 and cyclin D1 overexpression contribute to proliferation, migration and invasion in gastric cancer cells.," *Am. J. Transl. Res.*, vol. 9, no. 12, pp. 5671–5677, 2017.
- [198] T. B. Gavcovich, K. L. Walker, M. N. Bouchlaka, and C. M. Capitini, "Inhibition of the JAK/STAT and Bcl-2 Pathways Enhances Anti-Tumor Effects in an in Vitro model of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL)," *Blood*, vol. 126, no. 23, 2015.
- [199] G. W. Prager and C. C. Zielinski, "Angiogenesis in cancer," in *Biochemical Basis and Therapeutic Implications of Angiogenesis*, 2013.
- [200] D. Aldinucci and A. Colombatti, "The inflammatory chemokine CCL5 and cancer progression.," *Mediators Inflamm.*, vol. 2014, p. 292376, Jan. 2014.
- [201] M. Korc and R. E. Friesel, "The role of fibroblast growth factors in tumor growth.," *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 9, no. 5, pp. 639–51, Aug. 2009.
- [202] T. Yoshimura, "The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally?," *Cell. Mol. Immunol.*, vol. 15, no. 4, pp. 335–345, Apr. 2018.
- [203] X. Cui, S.-C. Yang, S. Sharma, N. Heuze-Vourc'h, and S. M. Dubinett, "IL-4 regulates COX-2 and PGE2 production in human non-small cell lung cancer," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 343, no. 4, pp. 995–1001, May 2006.
- [204] T. Rivera Vargas, E. Humblin, F. Végran, F. Ghiringhelli, and L. Apetoh, "TH9 cells in anti-tumor immunity.," *Semin. Immunopathol.*, vol. 39, no. 1, pp. 39–46, 2017.
- [205] C. Seifart *et al.*, "TNF-alpha, TNF-beta, IL-6, and IL-10 polymorphisms in patients with lung cancer.," *Dis. Markers*, vol. 21, no. 3, pp. 157–65, 2005.
- [206] J. Lin *et al.*, "The role of IL-7 in Immunity and Cancer.," *Anticancer Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 963–967, Mar. 2017.
- [207] Z.-H. Liu *et al.*, "Interleukin 7 signaling prevents apoptosis by regulating bcl-2 and bax via the p53 pathway in human non-small cell lung cancer cells.," *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, vol. 7, no. 3, pp. 870–81, 2014.
- [208] K. J. Sales *et al.*, "Interleukin-11 in endometrial adenocarcinoma is regulated by prostaglandin F 2 α -F-prostanoid receptor interaction via the calcium-calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway and negatively regulated by the

- regulator of calcineurin-1," *Am. J. Pathol.*, 2010.
- [209] L. G. Necula *et al.*, "IL-6 and IL-11 as markers for tumor aggressiveness and prognosis in gastric adenocarcinoma patients without mutations in Gp130 subunits," *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2012.
- [210] L. Ren, X. Wang, Z. Dong, J. Liu, and S. Zhang, "Bone metastasis from breast cancer involves elevated IL-11 expression and the gp130/STAT3 pathway," *Med. Oncol.*, vol. 30, no. 3, p. 634, Sep. 2013.
- [211] P. M. Ridker *et al.*, "Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease," *N. Engl. J. Med.*, vol. 377, no. 12, pp. 1119–1131, Sep. 2017.
- [212] P. M. Ridker *et al.*, "Effect of interleukin-1 β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial," *Lancet*, vol. 390, no. 10105, pp. 1833–1842, Oct. 2017.

